

Gluthathione S-transferase-resuscitation-promoting factor B recombinant protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of interferon- γ and interleukin-12 in mice splenocytes

by B 6

Submission date: 15-May-2021 06:31AM (UTC+0700)

Submission ID: 1586356590

File name: Medical_Journal_Indonesia_2019.pdf (600.9K)

Word count: 4084

Character count: 22649

Glutathione S-transferase-resuscitation-promoting factor B recombinant protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of interferon- γ and interleukin-12 in mice splenocytes

Andriansjah Rukmana,¹ Burhanuddin Rasyid,^{2,3} Fithriyah Sjatha¹

pISSN: 0853-1773 • eISSN: 2252-8083
https://doi.org/10.13181/mji.v28i3.2444
Med J Indones. 2019;28:234–40

Received: January 07, 2018

Accepted: May 16, 2019

Authors' affiliations:

¹Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia, ²Politeknik Kesehatan

Asar, Denpasar, Bali, Indonesia,

³Master Program of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

Corresponding author:

Andriansjah Rukmana

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Jalan Salemba 6, Senen, Central Jakarta 10320, DKI Jakarta, Indonesia

Tel/Fax: +62-21-3160491/+62-21-

3100810

E-mail: andriansjahrukmana@gmail.com

com

ABSTRACT

BACKGROUND As the only TB vaccine available, Bacillus Calmette-Guérin shows variable efficacy in adults and does not provide protection against the resuscitation of latent TB infections. Resuscitation-promoting factor B (RpfB) is a protein produced by *Mycobacterium tuberculosis* during the resuscitation phase and is promising as a novel TB vaccine. This study was aimed to analyze the immunogenicity of the glutathione S-transferase (GST)-RpfB recombinant protein on mice splenocytes *in vitro*.

METHODS After induction with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, the protein was extracted by sonication followed by solubilization in 8 M urea buffer. Protein was then re-natured and purified with a GST chromatography column. The isolated protein was confirmed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot using anti-GST antibodies, and its concentration was determined using the Bradford method. Each group of splenocytes was treated with 25 μ g/ml of the recombinant protein (GST-RpfB), GST, and phytohemagglutinin. Antigen induction was repeated twice at 24 and 72 hours. Then, supernatant was collected at 96 hours and interferon gamma (IFN γ), interleukin (IL-12, IL-4, and IL-10) levels were measured with enzyme-linked immunosorbent assays.

RESULTS GST-RpfB recombinant proteins were expressed in the form of inclusion bodies with a molecular weight approximately 66 kDa. Based on the independent t-test, GST-RpfB stimulated IFN γ and IL-12 production but not IL-4 and IL-10.

CONCLUSIONS The GST-RpfB protein has been immunogenically proven and is a potential candidate as a novel subunit TB vaccine.

KEYWORDS immunogens, *Mycobacterium tuberculosis*, recombinant fusion proteins, RpfB, spleen

Tuberculosis (TB) infection remains one of the leading causes of death worldwide, particularly in Indonesia. Within 2013, 670,000 people have died due to TB, and 210,000 of these were HIV-positive individuals.¹ Latent TB infection is the most common form; in 5% to 10% of individuals, latent infection develop into active TB.^{2,3} Currently, Bacillus Calmette-Guérin (BCG) is the only vaccine used to prevent TB infection. The BCG vaccine is relatively safe and can protect children against TB, but in adults it is less

effective in prevention and long-term protection from infections. The infection cases mainly occur in the endemic areas.⁴ As the BCG vaccine has a relatively low success rate shown in a number of clinical trials; major efforts are being made to develop novel vaccine candidates that are more effective against TB. Several new TB candidate vaccines (e.g., H4, DAR-901, and VPM1002) are now in clinical and late-stage development.⁵ However, additional studies to develop alternative vaccines are still warranted.

Copyright © 2019 Authors. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are properly cited.

The control of *Mycobacterium tuberculosis* infection is mainly mediated by cellular immunity, especially by CD4 T cells.⁶ Polyclonal T cell activation through simultaneous vaccination is necessary for the production of multiple cytokines. This is the foundational basis for the development of TB vaccines. Various cytokines are known to be associated with protection against TB, such as interferon gamma (IFN γ), tumor necrosis factor- α , and interleukins (IL-2, IL-6, and IL-12).⁷ Although the humoral immune response against TB infection remains elusive, the responses of several cytokines, such as IL-4 and IL-10, cannot be divided to regulate the balance of both the cellular and humoral responses.⁸ *In vivo* studies on mice showed that the resuscitation-promoting factors B and D (RpfB, RpfD) proteins are immunogenic.⁹ In humans, the immunogenic properties of all Rpf proteins can be detected in latent TB patients using immunoglobulin release assays. Moreover, RpfA, RpfB, RpfD, and RpfE induce IFN γ production in patients with active TB.¹⁰

In this study, the potency of glutathione S-transferase (GST)-RpfB recombinant protein construction in inducing the protective cellular immune system to TB infection were analyzed in experimental mice. The results of this study will determine whether this candidate protein could potentially be used as a TB vaccine. This study will form the basis for further studies on this protein.

METHODS

Bacterial strains and mice splenocytes

Escherichia coli BL21 containing a pGEX6P-1 vector with the insertion of the *rpfB* gene from *M. tuberculosis* Beijing (MRB4 [*E. coli* BL21pGEX6P-1 *rpfB*]) and pGEX6P-1 (MRB6 [*E. coli* BL21pGEX6P-1]) was used in this study. Splenocytes from 4–6-week-old “Deutschland, Denken, and Yonken” (DDY) mice were collected and used in this study. The ethical approval was from the Ethical Committee, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, No. 906/UN2.F1/ETHICS/2014.

Protein expression and pellet collection

MRB4 and MRB6 strains were grown in 5 ml Luria-Bertani (LB) medium amended with 100 μ g/ml of ampicillin. The cultures were incubated at 37°C

while agitated at 200g overnight. Bacteria were subsequently sub-cultured in 500 ml of liquid LB medium, and incubated at 28°C with 200g agitation. At an optical density at 600 nm of 0.4, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside was added to the culture for a final concentration of 0.1 mM, followed by incubation under the same conditions for 4 hours. Subsequently, the cultures were incubated on ice for 30 min, and then centrifuged at 5,000g for 10 min at 4°C. After the centrifugation, the pellets were collected and stored at -30°C until processing.

Extraction, solubilization, and protein refolding

Extraction of the recombinant protein (GST-RpfB) was performed through sonication and centrifugation of bacterial pellets using a lysis buffer (50 mM tris, 10% glycine, 0.1% triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], and 100 μ g/ml lysozyme), TNMFX-2M urea buffer (50 mM tris-base, 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], and 2M urea), and TNMFX-0.1% triton X-100 buffer (50 mM tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.1% triton X-100). After centrifugation, the pellet was solubilized using 8 M urea buffer, and then centrifuged again to obtain the supernatant containing the GST-RpfB recombinant protein.

GST-RpfB was dissolved into 8 M urea buffer and further diluted into 20 ml of refolding buffer consisting of 50 mM tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM reduced glutathione, 1 mM dithiothreitol, and 1 mM PMSF. The solution was diluted with a stirrer and incubated overnight at 4°C.

Isolation of recombinant proteins

The re-natured GST-RpfB recombinant protein was further isolated using an affinity chromatography column (Fermentas, catalog number 16107) against GST, based on the manufacturer's instructions. Columns containing the slurry were equilibrated for 1 hour in a shaker with 10 ml of the refolding buffer described above. The equilibrium buffer was then discharged, and protein samples were added to the column. Incubation was continued in the shaker for 1 hour. Non-binding proteins were drained from the column and were stored as flowthrough. The columns were washed twice with the refolding buffer. GST-RpfB bound in the resin was subsequently eluted 3–4 times with 3 ml of buffer consisting of 50 mM tris,

150 mM NaCl, and 10 mM reduced glutathione. The GST-RpFB isolation result was confirmed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis using an anti-GST antibody. The protein concentration was determined using Bradford assay.

Splenocyte preparation

The splenocytes used in this study were isolated from DDY mice 4–6 weeks of age. The mice were bred at the Animal Laboratory, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia. Mice were euthanized by cervical dislocation. The spleens were isolated under aseptic conditions, homogenized in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium, and then centrifuged at 2,000g for 5 min at 4°C. The obtained pellets were washed twice with the medium, and then centrifuged again under the same conditions. The density of splenocyte was adjusted to 2×10^5 cells/ml.

Cellular immunity test on mouse splenocytes

Using a 96-well culture plate, splenocytes were cultured in RPMI-1640 medium containing L-glutamine, 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonate, 10% fetal bovine serum,

100 µg/ml penicillin-streptomycin, and 100 µg/ml antibiotic-antimycotic. In this immunogenicity test, three culture groups were stimulated separately: with 25 µg/ml GST-RpFB or GST-RpFD or 25 µg/ml GST protein. About 1–2% of phytohemagglutinin (PHA) mitogen (Invitrogen) was used as the positive control. A negative control group that was not stimulated was included. Antigen induction was repeated twice, 24 and 72 hours after initial induction. The supernatants of each group were collected after 96 hours of incubation, followed by centrifugation at 1,000g for 15 min. The production of IL-12 and IFN γ were measured using commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits (Cusabio Biotech, USA).

Statistical analysis

Data were statistically analyzed with an independent t-test. A difference with $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Expression, isolation, and purification of GST-RpFB recombinant protein

In order to isolate the recombinant protein, the GST-RpFB protein that formed in the inclusion bodies

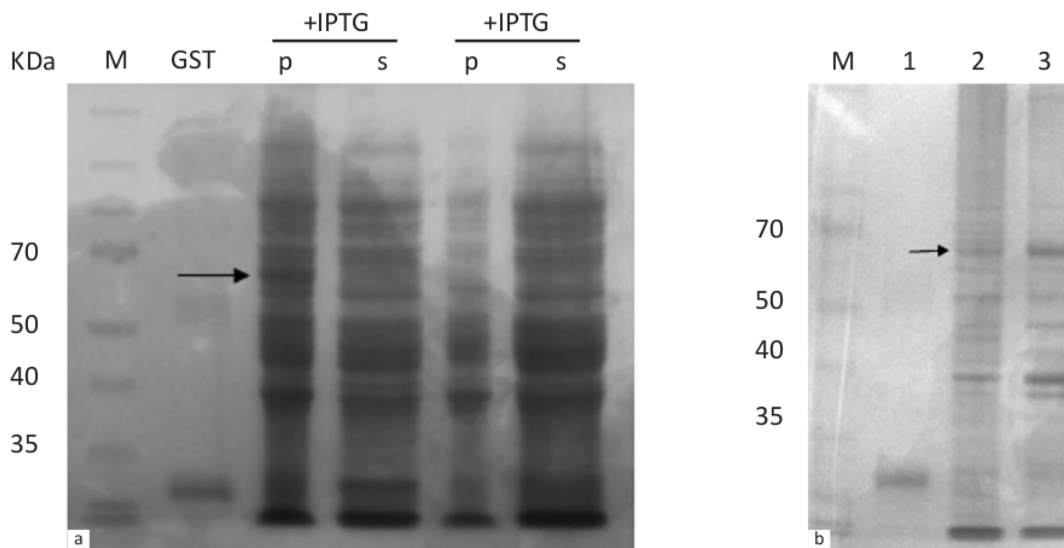


Figure 1. Detection and confirmation GST-RpFB expression using SDS-PAGE. (a) SDS-PAGE from crude cells; (b) SDS-PAGE after solubilizing and refolding; Lane 1, GST protein; Lane 2 and 3, supernatants (8 M urea buffer). The black arrow indicates the protein band that is identical to the molecular mass of GST-RpFB. KDa=kilodalton; M=marker; IPTG=isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; p=pellet; s=supernatant; GST-RpFB=glutathione S-transferase-resuscitation-promoting factor B; SDS-PAGE=sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

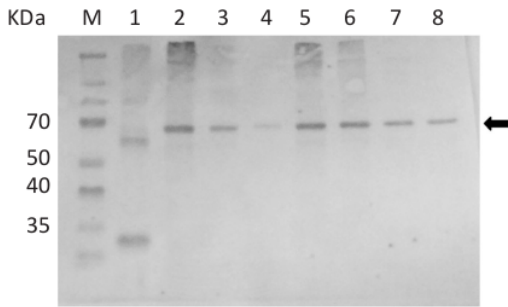


Figure 2. Western blot of GST-RpFB after isolation using the affinity of the chromatography column to GST. Lane 1, GST; Lane 2, flowthrough; Lane 3 and 4, wash; Lane 5–8, eluate. The black arrow indicates the protein band identical to the molecular mass of GST-RpFB. KDa=kilodalton; M=Marker; GST-RpFB=glutathione S-transferase-resuscitation-promoting factor B

were extracted by centrifugation using TNMFX-2M urea buffer and TNMFX-0.1% triton X-100 buffer, followed by solubilization with 8 M urea buffer (Figure 1). The results showed that the GST-RpFB recombinant can be solubilized in the buffer and can be found in the supernatant fraction. Western blot analysis with anti-GST antibodies against protein re-naturation, which was isolated in the affinity chromatography column, confirmed that the protein present was the GST-RpFB recombinant protein (Figure 2).

Cellular immunity response

The responses of cytokines IL-12 and IFN γ indicated that the splenocyte cultures stimulated with GST-RpFB had significant differences ($p < 0.05$) compared to the negative control. The stimulated splenocyte culture also showed a higher levels of IL-12 and IFN γ compared to the response of the splenocytes stimulated with GST protein ($p < 0.05$; Figure 3). Analysis of IL-4 and IL-10 in mice splenocytes showed that recombinant protein (RpFB) was able to generate a significantly greater response (IL-4 production) than the negative control ($p < 0.05$). Meanwhile, there was no difference in the response (IL-4) between the splenocyte culture stimulated with GST-RpFB compared to that stimulated with only the GST protein. Splenocytes that were stimulated with PHA (positive control) had a significantly higher concentration of IL-4 than in splenocytes stimulated with GST-RpFB or the GST protein ($p < 0.05$), validating the results of the assay (Figure 3).

DISCUSSION

TB has become a major problem in the world since the disease has caused a large number of deaths, including in Indonesia.¹ The spread of this disease can be reduced by several methods, one of those is vaccination. However, the BCG vaccine that is currently available is relatively ineffective. Finding new candidate vaccines (as a substitute or a companion to the BCG vaccine) is still a challenge, even though several candidate vaccines were already undergoing clinical trials.¹ This encourages a study of TB proteins that can potentially be used as a vaccine. In this study, RpFB recombinant proteins used in conjunction with the GST protein was assessed for its capabilities in inducing cellular immunity to TB. The use of GST in this study was expected to increase solubility and facilitate the isolation and purification processes of the recombinant proteins.¹¹ Proteins were purified with the GST gene fusion system that has been used successfully in a variety of immunological studies and in vaccine production.¹² Nevertheless, the GST-RpFB recombinant protein from this study was more commonly found in the pellet fraction, which was suspected to be inclusion bodies. Although various attempts have been made to create the GST-RpFB recombinant protein in supernatant fractions, such as by lowering the temperature and reducing the concentration of IPTG (data not shown), pellet fractions remain the dominant method to create recombinant proteins.

The purified GST-RpFB recombinant protein was tested for its immunogenicity with three times antigen exposure in mice splenocytes *in vitro*. Among the four tested cytokines, the GST-RpFB recombinant protein gave strong IFN γ and IL-12 responses. These two cytokines were proven to play a significant role in protection against TB where they can control both active and latent TB.¹³ IFN γ is an immunostimulator and an immunomodulator cytokine that plays an important role in major histocompatibility complex (MHC) class II activation, which leads to the type 1 helper (TH1) response as a major response in TB protection. During TB infection, IFN γ is produced in both CD4+ and CD8+ T cells, but can also be secreted by infected macrophages dependent on IL-12. Although IFN γ production alone is insufficient to control *M. tuberculosis* infection, it is required for protection against the pathogen. IL-12 is an pro-inflammatory cytokine that plays an important

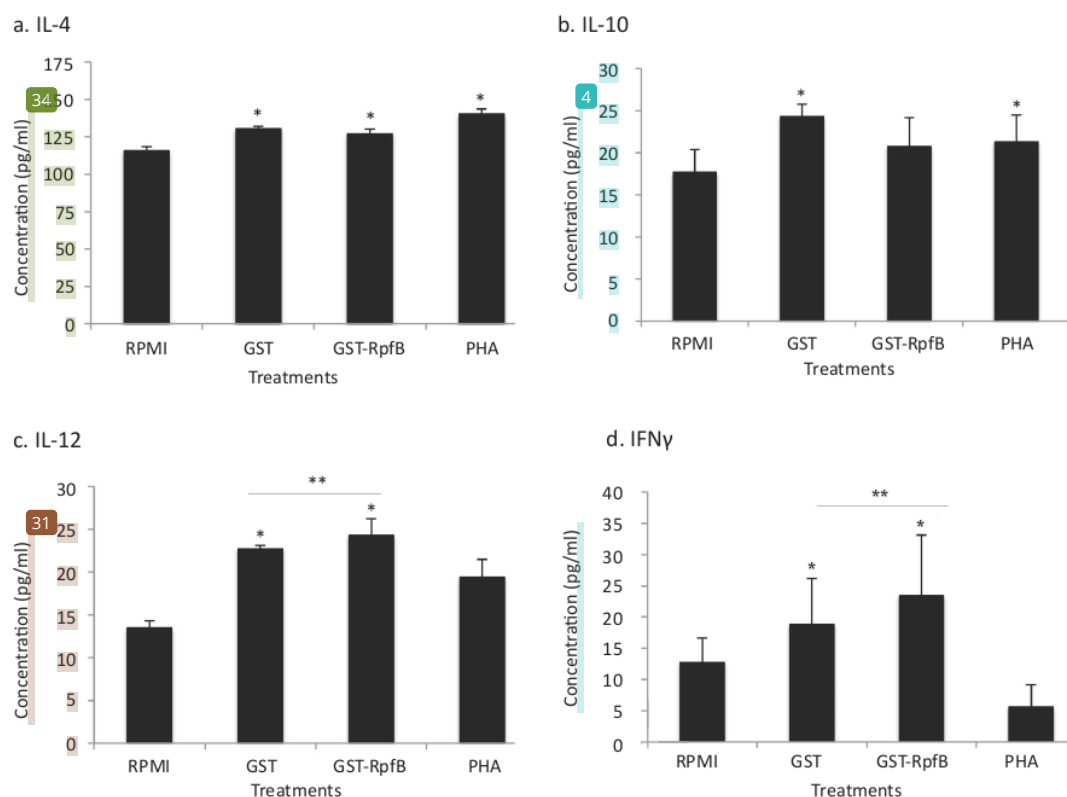


Figure 3. IL-4, IL-10, IL-12, and IFN γ responses of splenocytes treated by RPMI (negative control), GST, GST-RpFB, and PHA (positive control). Asterisk symbols (*) indicate significant differences ($p < 0.05$) to RPMI; double asterisk (**) show significant differences ($p < 0.05$) between GST and GST-RpFB. IL=interleukin; IFN γ =interferon gamma; RPMI=Roswell Park Memorial Institute; GST-RpFB=glutathione S-transferase-resuscitation-promoting factor B; PHA=phytohemagglutinin

role in naive Th cell differentiation into Th1, which also stimulates the production of IFN γ by reducing the suppressive effect of IL-4 on IFN γ . In addition, macrophages also secrete IL-12 to induce IFN γ production by T cells, which increases phagocytosis and oxidative burst. In patients with multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), IFN γ improves the function of the macrophages function against *M. tuberculosis*. Monocyte-derived macrophages of MDR-TB patients demonstrate a defective immune response to *M. tuberculosis*, but pre-treatment with recombinant human IFN- γ improves their immune response. This indicates that IFN γ can be used as an adjuvant for the treatment of patients with poor responsiveness to TB therapy.¹⁴ This result shows that IFN γ and IL-12 are major cytokines induced by the Rpf protein. This is consistent with previous Rpf immunogenicity studies derived from *M. luteus*. These were highly homologous with RpfB, which

showed strong immunogenicity.⁹ An *in vivo* study on C57BL/6 and BALB/c mice infected with *M. tuberculosis* vaccinated with BCG found IFN γ - and IL-12- specific responses against the GST-RpFB recombinant protein in mice splenocytes 4 weeks after infection.¹⁵ These results were similar for other mice strains, such as C3H/Hen, in which immunization with a multiphasic vaccine (including Rpf proteins of *M. tuberculosis*) was shown to offer protection against infection by the disease.⁹ The Rpf protein stimulates IgG1 and IgG2a responses, T cell proliferation, and the upregulation of IFN γ and IL-12 in C57BL/6 mice. Vaccination of mice with the Rpf protein can also inhibit the growth and proliferation of *M. tuberculosis* H37Rv.¹⁶ Another study demonstrated that dendritic cells induced by RpfB had increased production of cell surface molecules (i.e., CD80, CD86, MHC class I, and MHC class II) and pro-inflammatory cytokines, among which was IL-12.¹⁷

Conversely, this GST-Rpfb recombinant protein did not induce the production of IL-4 and IL-10 in mice splenocytes. IL-4 is a cytokine that differentiates naive Th cells into Th2, elevating the CD4 response in the mature plasma cells to produce antibodies. This results show that the GST-Rpfb recombinant protein did not stimulate IL-4 production, indicating that this antigen mainly induced a cellular response rather than a humoral response. Previous studies of Rpf vaccinated mice also showed there was no stimulation of IL-4 cytokine production.¹⁷ On the other hand, IL-4 is known to downregulate Th1 cells and have negative effects on IFN γ and IL-12 production.^{7,18} Meanwhile, IL-10 is known to have anti-inflammatory activity that could inhibit the action of macrophages where they can help eliminate *M. tuberculosis*.⁷ In contrast to IFN γ , IL-10 is considered to be an anti-inflammatory cytokine produced by T cells during infection by *M. tuberculosis*. It leads to the downregulation of IL-12 production by the macrophages, which subsequently decreases IFN γ production by T cells. IL-10 directly limits Th1 immunity and exacerbates diseases.⁷ However, the PHA mitogen used in this study revealed an opposing function; it was assumed that PHA stimulated Th2 cells and inhibited Th1 cells, which stimulated the production of IL-4 and IL-10 but inhibited the production of IL-12 and IFN γ .

Based on the stimulated cytokine profile of this study, the GST-Rpfb recombinant protein has the potential to be developed for clinical use as a TB vaccine. This results revealed that cellular immunity arises as a response to the GST-Rpfb protein, where the protein is able to induce the cytokines that are known to be the major response of cellular immunity to *M. tuberculosis* infection in humans. Although this current research is carried out on test animals (as a requirement of the vaccine research), this seed vaccine can perhaps be used in humans in the future, especially to prevent latent TB.^{2,3} Moreover, the binding of the RpfB protein to GST may lead to increase cellular immunity responses in the splenocytes. Since GST is a protein naturally found in worms (*Schistosoma japonicum*), recombination of RpfB with GST may lead to double protective immunity in areas with endemic worms and TB infections. Worm infections are known to play a role in the low efficacy of the TB vaccine due to the opposing effects of the cellular immune response.^{19,20}

However, the protective efficacy of GST-Rpfb against single-infection *M. tuberculosis* or co-infection with helminths requires further research.

This study was conducted on Balb/C mice, which is a common animal model that has been used widely in vaccine research. This mice strain is easy to raise and maintain, and generally gives uniform immune responses to all tested antigens. Assessing the GST-Rpfb recombinant fusion protein on animal models is a necessary early step in evaluating its immunogenicity and antigenicity. As immune responses consist of both cellular and humoral responses, the cellular immune response found in this study need to be complemented by a humoral immunity profiling in future study. It is necessary to better understand candidate seed vaccines that have the ability to protect against bacterial infections in tested animals (e.g. a challenge test before continuing on with clinical trials).

In conclusion, the GST-Rpfb recombinant protein used in this study demonstrated a capability in inducing IFN γ and IL-12 in mice models. These two cytokines are known to play a role in cellular immune response against *M. tuberculosis* infection in humans.

Conflict of Interest

The authors affirm no conflict of interest in this study.

Acknowledgment

The authors would like to thank the Ministry of Research, Technology & Higher Education.

Funding Sources

This research was funded by Ministry of Research, Technology & Higher Education.

REFERENCES

1. World Health Organization (WHO) [internet]. Global Tuberculosis Report 2014. Geneva: WHO Press. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf
2. Center for Disease Control. Latent Tuberculosis Infection: A Guide for Primary Health Care Providers. In: U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention National Center for HIV/AIDS, STD, and TB Prevention Division of Tuberculosis Elimination. Atlanta. The State University of New Jersey. 2013. iv+36 pp.
3. Kondratieva T, Azhikina T, Nikonenko B, Kaprelyants A, Apt A. Latent tuberculosis infection: what we know about its genetic control? *Tuberculosis*. 2014;94(5):462–8.
4. Rubio-Reyes P, Parlane NA, Buddle BM, Wedlock DN, Rehm BH. Immunological properties and protective efficacy of a single mycobacterial antigen displayed on polyhydroxybutyrate beads. *Microb Biotechnol*. 2017;10(6):1434–40.
5. Voss G, Casimiro D, Neyrolles O, Williams A, Kaufmann SH, McShane H, et al. Progress and challenges in TB vaccine development. *F1000Research*. 2018;7:199.
6. Mayer-Barber KD, Barber DL. Innate and adaptive cellular immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection.

- Cold Spring Harb Perspect Med. 2015;5(12):a018424.
7. Domingo-Gonzales R, Prince O, Cooper A, Khader SA. Cytokines and chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection. Microbial Spectr. 2016;4(5).
8. Jacobs AJ, Mongkolsapaya J, Sreaton GR, McShane H, Wilkinson RJ. Antibodies and tuberculosis. Tuberculosis. 2016;101:102–13.
9. Leung-Theung-Long S, Gouanvic M, Coupet CA, Ray A, Tupin E, Vestre N, et al. A novel MVA-based multiphasic vaccine for prevention or treatment of tuberculosis induces broad and multifunctional cell-mediated immunity in mice and primates. PLoS One. 2015;10(11):e0143552.
10. Rosser A, Stover C, Pareek M, Mukamolova GV. Resuscitation-promoting factors are important determinants of the pathophysiology in *Mycobacterium tuberculosis* infection. Crit Rev Microbiol. 2017;43(5):621–30.
11. Liu L, You X, Chen L, Zeng Y, Tang S, Yu M, et al. Immunogenicity of Cpn0425 and its localization in cells infected with *Chlamydomonas pneumoniae*. Mol Med Rep. 2012;6:1239–42.
12. Zhao X, Li G, Liang S. Several affinity tags commonly used in chromatography purification. J Anal Methods Chem. 2013;2013:581093.
13. Wang S, Li Y, Shen Y, Wu J, Gao Y, Zhang S, et al. Screening and identification of a six-cytokine biosignature for detecting TB infection and discriminating active from latent TB. J Transl Med. 2018;16(1):206.
14. Khan TA, Mazhar H, Saleha S, Tipu HN, Muhammad N, Abbas MN. Interferon-gamma improves macrophages function against *M. tuberculosis* in multidrug-resistant tuberculosis patients. Chemother Res Pract. 2016;2016:7295390.
15. Romano M, Aryan E, Korf H, Bruffaerts N, Franken CL, Ottenhoff THM, et al. Potential of *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factors as antigens in novel tuberculosis sub-unit vaccines. Microbes Infect. 2012;14(1):86–95.
16. Zhao S, Song X, Zhao Y, Qiu Y, Mao F, Zhang C, et al. Protective and therapeutic effects of the resuscitation-promoting factor domain and its mutants against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Pathog Dis. 2015;73(3).
17. Kim JS, Kim WS, Choi HG, Jang B, Lee K, Park JH, et al. *Mycobacterium tuberculosis* RpfB drives Th1-type T cell immunity via a TLR4-dependent activation of dendritic cells. J Leukoc Biol. 2013;94(4):733–49.
18. He S, Yang S, Zhao Q, Wang L, Liu H, Sheng Y, et al. Association of IL4, IL6, and IL10 polymorphisms with pulmonary tuberculosis in a Tibetan Chinese population. Oncotarget. 2018;9(23):16418–26.
19. Harper S, Speicher DW. Purifications of proteins fused to glutathione S-transferase. Methods Mol Biol. 2011;681:259–80.
20. Lang R, Schick J. Review: impact of helminth infection on antimycobacterial immunity—a focus on the macrophage. Front Immunol. 2017;8:1864.

Gluthathione S-transferase-resuscitation-promoting factor B recombinant protein of Mycobacterium tuberculosis induces the production of interferon- γ and interleukin-12 in mice splenocytes

ORIGINALITY REPORT

17%	15%	13%	0%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov Internet Source	1%
2	sites.kowsarpub.com Internet Source	1%
3	www.plantphysiol.org Internet Source	1%
4	etheses.bham.ac.uk Internet Source	1%
5	Yuqing Li, Jumei Zeng, Jianfang Shi, Mingchao Wang, Muding Rao, Chaolun Xue, Yanli Du, Zheng-Guo He. " A Proteome-Scale Identification of Novel Antigenic Proteins in toward Diagnostic and Vaccine Development ", Journal of Proteome Research, 2010 Publication	1%
6	jb.asm.org Internet Source	1%

7	bmcinfectdis.biomedcentral.com Internet Source	1 %
8	mro.massey.ac.nz Internet Source	<1 %
9	pure.mpg.de Internet Source	<1 %
10	Thomas S. Blacker, WeiYue Chen, Edward Avezov, Richard J. Marsh, Michael R. Duchon, Clemens F. Kaminski, Angus J. Bain. "Investigating State Restriction in Fluorescent Protein FRET Using Time-Resolved Fluorescence and Anisotropy", The Journal of Physical Chemistry C, 2017 Publication	<1 %
11	m.japsonline.com Internet Source	<1 %
12	patentscope.wipo.int Internet Source	<1 %
13	A G Bais. "A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions", Journal of Clinical Pathology, 2005 Publication	<1 %
14	ajplung.physiology.org Internet Source	<1 %

en.bio-protocol.org

15	Internet Source	<1 %
16	statpearls.com Internet Source	<1 %
17	www.foodandnutritionjournal.org Internet Source	<1 %
18	www.koreascience.or.kr Internet Source	<1 %
19	www.pubmedcentral.nih.gov Internet Source	<1 %
20	thno.org Internet Source	<1 %
21	actamedindones.org Internet Source	<1 %
22	iji.sums.ac.ir Internet Source	<1 %
23	insights.ovid.com Internet Source	<1 %
24	www.deepdyve.com Internet Source	<1 %
25	Sarra Setrerrahmane, Jian Yu, Jingchao Hao, Heng Zheng, Hanmei Xu. "Novel production method of innovative antiangiogenic and	<1 %

antitumor small peptides in *Escherichia coli*",
Drug Design, Development and Therapy, 2017

Publication

26	edoc.unibas.ch Internet Source	<1 %
27	eprints.undip.ac.id Internet Source	<1 %
28	media.neliti.com Internet Source	<1 %
29	www.jci.org Internet Source	<1 %
30	zombiedoc.com Internet Source	<1 %
31	downloads.hindawi.com Internet Source	<1 %
32	res.mdpi.com Internet Source	<1 %
33	watermark.silverchair.com Internet Source	<1 %
34	www.iracon2016.com Internet Source	<1 %
35	Carlos Sánchez, Luis Ulloa, Rafael J Montoro, José López-Barneo, Jesús Avila. "NMDA-glutamate receptors regulate phosphorylation	<1 %

of dendritic cytoskeletal proteins in the hippocampus", Brain Research, 1997

Publication

36

Sidney Pestka, Christopher D. Krause, Devanand Sarkar, Mark R. Walter, Yufang Shi, Paul B. Fisher. " I -10 R C R ", Annual Review of Immunology, 2004

Publication

<1 %

37

doi.org

Internet Source

<1 %

38

innovareacademics.in

Internet Source

<1 %

39

journal-cdn.frontiersin.org

Internet Source

<1 %

40

journal.frontiersin.org

Internet Source

<1 %

41

livrepository.liverpool.ac.uk

Internet Source

<1 %

42

www.dovepress.com

Internet Source

<1 %

43

www.scielo.br

Internet Source

<1 %

44

Jong-Seok Kim, Woo Sik Kim, Han-Gyu Choi, Byungki Jang, Keehoon Lee, Jong-Hwan Park, Hwa-Jung Kim, Sang-Nae Cho, Sung Jae Shin. " RpfB drives Th1-type T cell immunity via a

<1 %

TLR4-dependent activation of dendritic cells ",
Journal of Leukocyte Biology, 2013

Publication

45

"Handbook of Global Tuberculosis Control",
Springer Science and Business Media LLC,
2017

Publication

<1 %

46

Daniel L. Hurdiss, Priscila El Kazzi, Lisa Bauer,
Nicolas Papageorgiou et al. "Fluoxetine
targets an allosteric site in the enterovirus 2C
AAA+ ATPase and stabilizes the hexameric
complex", Cold Spring Harbor Laboratory,
2021

Publication

<1 %

47

Gerald Voss, Danilo Casimiro, Olivier
Neyrolles, Ann Williams et al. "Progress and
challenges in TB vaccine development",
F1000Research, 2018

Publication

<1 %

48

Nury NUSDwinuringtyas, Tresia Fransiska,
Peggy Sunarjo, Kevin Triangto, Sopiudin
Dahlan. "Agreement Test Between The Six
Minutes Walking Test And Four Meter Gait
Speed", Cold Spring Harbor Laboratory, 2020

Publication

<1 %

49

Yaoyao Chu, Yan Liu, Jingyu Li, Qiaohan Wang,
Qingli Gong. "Nutrient Enrichment Regulates
the Growth and Physiological Responses of

<1 %

Saccharina japonica to Ocean Acidification",
Journal of Ocean University of China, 2020
Publication

Exclude quotes On
Exclude bibliography On

Exclude matches Off

Optimization of pGEX System to Express and Isolate Mycobacterium tuberculosis Inclusion Body Protein in Combining with Modified Refolding Method

by B 5

Submission date: 15-May-2021 06:30AM (UTC+0700)

Submission ID: 1586356077

File name: Makara_Journal_of_Science_2018.pdf (1.01M)

Word count: 5043

Character count: 27283

12-20-2018

Optimization of pGEX System to Express and Isolate Mycobacterium tuberculosis Inclusion Body Protein in Combining with Modified Refolding Method

Andriansjah Rukmana

*Department of Microbiology, Medical Faculty, Universitas Indonesia, Jakarta 10320, Indonesia,
andriansjah.ms@ui.ac.id*

Burhanuddin Burhanuddin

Biomedical Student, Medical Faculty, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

Andi Yasmon

Department of Microbiology, Medical Faculty, Universitas Indonesia, Jakarta 10320, Indonesia



Follow this and additional works at: <https://scholarhub.ui.ac.id/science>

Recommended Citation

Rukmana, Andriansjah; Burhanuddin, Burhanuddin; and Yasmon, Andi (2018) "Optimization of pGEX System to Express and Isolate Mycobacterium tuberculosis Inclusion Body Protein in Combining with Modified Refolding Method," *Makara Journal of Science*: Vol. 22 : Iss. 4 , Article 1.

DOI: 10.7454/mss.v22i4.10249

Available at: <https://scholarhub.ui.ac.id/science/vol22/iss4/1>



This Article is brought to you for free and open access by the Universitas Indonesia at UI Scholars Hub. It has been accepted for inclusion in *Makara Journal of Science* by an authorized editor of UI Scholars Hub.

Optimization of pGEX System to Express and Isolate Mycobacterium tuberculosis Inclusion Body Protein in Combining with Modified Refolding Method

Cover Page Footnote

This research was fund by Hibah Kompetitif DIKTI 2014-2016.

Optimization of pGEX System to Express and Isolate *Mycobacterium tuberculosis* Inclusion Body Protein in Combining with Modified Refolding Method

Andriansjah Rukmana^{1*}, Burhanuddin², and Andi Yasmon¹

1. Department of Microbiology, Medical Faculty, Universitas Indonesia, Jakarta 10320, Indonesia

2. Biomedical Student, Medical Faculty, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

*E-mail: andriansjah.ms@ui.ac.id

Received June 7, 2017 | Accepted Dec 3, 2018

Abstract

Antigen sub units for vaccine studies are typically isolated from recombinant proteins in an expression system. However, not all protein expression systems are used to express the specific protein. In this study, we optimized the pGEX system combined with the modified protein refolding to express and isolate *M. tuberculosis* proteins, especially proteins that are expressed as an inclusion body. Resuscitation promoting factor B (RpfB) protein is one of the Resuscitation promoting factor (Rpf) family of proteins that has been studied for its ability to induce cellular immunity in animal tests. Silico analyses demonstrate how RpfB is included in cell wall and cell processes. The Rpf family proteins are promising antigens that can be used as a TB vaccine candidate. The polymerase chain reaction was briefly performed using specific primers to amplify the full length of the *rpfB*. PCR amplification products were then purified, cut by restriction endonucleases, and cloned in to pGEX 6-P1. Protein expression was done in the *Escherichia coli* BL21 strain, and expressed protein was isolated using the modified protein refolding and solubilization method. The complex protein expression that appeared as inclusion bodies were successfully isolated and can be detected as complex GST-RpfB through the western blotting process. Our study results indicate that this system and our modified method are suitable for *M. tuberculosis* inclusion body protein expression and isolation.

Abstrak

Optimasi System Ekspresi pGEX untuk Mengekspresikan dan Mengisolasi Protein RpfB *Mycobacterium tuberculosis* dalam Bentuk Badan Inklusi Menggunakan Metode Refolding yang Dimodifikasi. Antigen sub unit untuk studi vaksin umumnya diisolasi dari protein rekombinan menggunakan suatu sistem ekspresi. Sementara itu, tidak semua sistem ekspresi protein dapat digunakan untuk mengekspresikan protein tertentu. Dalam studi ini kami melakukan optimasi sistem pGEX untuk mengekspresikan dan mengisolasi protein *M. tuberculosis* yang diekspresikan sebagai badan inklusi. Resuscitation promoting factor B (RpfB) protein adalah salah satu protein keluarga Resuscitation promoting factor (Rpf) yang telah dipelajari kemampuannya dalam menginduksi imunitas seluler hewan uji. RpfB protein terlibat dalam pembentukan dinding sel dan proses-proses dalam sel. Protein keluarga Rpf berpotensi sebagai antigen yang dapat digunakan sebagai kandidat vaksin TB. Secara singkat, reaksi berantai polimerase menggunakan primer spesifik digunakan untuk mendapatkan panjang DNA sintetik *rpfB* yang dibutuhkan. Produk amplifikasi PCR kemudian dimurnikan, dipotong oleh ensim restriksi endonuklease yang dilanjutkan dengan pengklonan kedalam pGEX 6-P1. Ekspresi protein dilakukan di bakteri non patogen *Escherichia coli* strain BL21, selanjutnya protein terekspresi diisolasi menggunakan metode refolding dan solubilisasi yang dimodifikasi. Komplek protein yang terekspresi muncul sebagai badan inklusi dan terdeteksi sebagai komplek GST-RpfB melalui metode western blotting. Hasil studi menunjukkan sistem pGEX dan modifikasi metode solubilisasi dan refolding dapat mengisolasi protein *M. tuberculosis* yang diekspresikan dalam bentuk badan inklusi.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Beijing strain, RpfB, recombinant protein

Introduction

20
Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* and is one of the most serious health problems in Indonesia. The World Health Organ-

ization (WHO) reported that the mortality rate of tuberculosis (TB) disease in Indonesia is about 67,000 cases/year and 2,100 cases/year for TB-HIV [1]. Increasing TB infections can be prevented by preventative means such as vaccination. However, the BCG vaccine used

broadly in the world has variable protective efficacy, ranging from 0 to 77% [2,3]. The weakness of the BCG vaccine has led to new vaccine studies with the aim of determining alternative vaccines to use as primary or booster vaccines.

The *rpj* family consists of five genes, i.e. *rpjA*, *B*, *C*, *D*, and *E*, which play a role in inducing the bacteria to change from a stationary condition to an active growth condition [4,5]. The experiment results do by some researchers have shown the capability of this family to induce antibodies and the cellular immune system in animal tests [6]. Conversely, further studies reveal that the RpfB and RpfD proteins stimulated a higher response of cellular immunity compared to the other proteins in this family [7]. Both characteristics of the Rpf protein family, the ability to induce stationary bacterial cells and the ability to generate immune responses, are interesting study themes for further investigation. Nonetheless, exploring protein expression systems is necessary as it continues to be a challenge to find alternative systems that can be used to express *M. tuberculosis* proteins.

The aims of this study were to examine the manufacturing of the recombinant protein of *M. tuberculosis*, Beijing strain, from Indonesian patients collected by Pusat Biomedis dan Teknologi Kesehatan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. The focus was particularly RpfB, in the pGEX system, and to examine the protein expression system itself. Several studies demonstrate success in cloning and in the protein expression of *M. tuberculosis* proteins in vector systems, such as the pET system, the pColdII system, the pGEX system itself, and others [8-10]. Although the pGEX system has been used for protein expression of *M. tuberculosis*, information on the pGEX system is still limited, especially for proteins that have the potential to be expressed as inclusion bodies. Therefore, it is necessary for further testing of the pGEX system with other proteins of *M. tuberculosis*. The pGEX system has some advantages compared to other systems. One of these advantages is the availability of anti-GST, as the expression of GST fusion proteins can be easily analyzed using western blotting. Similarly, tools to isolate and purify the proteins based on GST affinity are available to simplify and shorten the workflow. The results of this study provide useful information on use of the pGEX system, along with useful information on the protocol to obtain recombinant *M. tuberculosis* proteins. The RpfB protein designed and produced in this study can be used in subsequent studies with the aim of discovering vaccine candidates that can be produced in Indonesia.

Materials and Methods

Strain. The *M. tuberculosis* H37Rv strain used in this study is a bacterial stock from the Department of Microbiology, Medical Faculty, Universitas Indonesia. The Beijing strain was kindly donated from the Center for

Biomedical and Health Technology, Ministry of Health Republic of Indonesia (Pusat Biomedis dan Teknologi Kesehatan Kementerian Kesehatan Republik, Indonesia).

Genomic DNA extraction. *M. tuberculosis* genomic DNA was isolated from the cells using the boiling method [11]. The bacterial cells were scraped from Lowenstein-Jensen media and inserted into 1.5 mL tubes, containing 500 µL sterile dH₂O. They were then incubated at 100 °C in a heat block for 10 minutes. The tubes were centrifuged to separate genomic DNA from cell debris. The supernatant containing *M. tuberculosis* genomic DNA was isolated and stored at minus 30 °C until used.

Amplification of the *rpjB* gene. The *rpjB* gene was amplified using the polymerase chain reaction (PCR) method with specific primers annealing to the *rpjB* region (primers used in this study are not published for patent purposes). The PCR product size was confirmed by gel electrophoresis and then purified using a PCR purification kit (Qiagen). The purified PCR product was then used for cloning.

Cloning of the *rpjB* gene into the pGEX system and transformation. pGEX 6-1 and *rpjB* PCR products were digested by *Eco*RI and *Xho*I restriction enzymes (Fermentas) and then purified before ligation. The ligation process was done using T4 DNA ligase (Fermentas), resulting in plasmid harboring the inserted gene. Transformation of recombinant plasmid into *E. coli* DH5α was done using the heat shock method and resulted in the MRB1 and MRB3 strain [12]. The ligation product was mixed with bacteria competent cells in a 1.5 mL plastic tube and incubated on ice for 30 minutes, and then incubated under heat shock conditions at 42 °C for 1.5 minutes. The bacterial cells were sub cultured in LB medium and shaken for 1 hour at 37 °C. LB agar containing 100 µg/mL ampicillin was used to select bacterial cells carrying recombinant plasmid. Plasmids isolated from bacteria growing on the selective medium were examined for the correct orientation of the inserted gene by PCR, and for correct base composition by sequencing. The plasmid containing the *rpjB* gene was then transformed into *E. coli* strain BL21 as the expression host resulting in the MRB2 and MRB4 strain.

RpfB protein expression. Strain MRB2 and MRB4 was grown on selective media until the optical density (OD₆₀₀) reached 0.4, and then IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) was added to a final concentration of 1 mM. Incubation was continued for 4 hours before bacterial cells were harvested. Ten milliliters of 1x phosphate-buffered saline (PBS) was added to the bacterial pellet after centrifugation and the re-suspended pellet was subjected to sonication using a Memert sonicator. Lysed bacterial cells after sonication was analyzed by electrophoresis on a 15% SDS-

polyacrylamide gel (SDS-PAGE) to detect the expression of RpfB protein. RpfB protein expression was confirmed by western blotting with anti GST antibody.

Extraction, solubilization, and refolding of recombinant RpfB protein. The pellet, from centrifugation after sonication, was re-suspended in the lysis buffer containing lysozyme. Sonication was performed again for 30 minutes to break down cell membranes and then subjected for centrifugation at 5000 rpm. This was done for 10 minutes at 4 °C. Subsequently, the pellet was re-suspended in buffer TNMFX — 2M urea containing 50 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 2 M urea — then subjected to 10 minutes sonication, followed by centrifugation at 5,000 rpm for 10 minutes at 4 °C. Pellets were then re-suspended in buffer TNMFX-0.1% Triton-X100 contained 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.1% Triton-X100. The suspension was sonicated for 10 minutes, incubated for 30 minutes at 4 °C, and then centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes. The pellet was re-suspended in the solubilization buffer containing 8M urea, then centrifuged at 1000 rpm for 10 minutes at 4 °C. The supernatant was collected and stored at -80 °C until refolding. For refolding, the supernatant was diluted fivefold in the refolding buffer containing 50 mM Tris - HCl, 100 mM NaCl, 1 mM reduced glutathione, 1 mM DTT, and 1 mM PMSF. The diluted solution was incubated overnight at 4 °C with stirring.

Isolation of recombinant protein RpfB. Refolded recombinant RpfB protein was isolated using the GST affinity column; this was based on the manufacturer's instructions. Prior to this, the affinity column was equilibrated with the equilibration buffer containing 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM reduced glutathione, 1 mM DTT, and 1 mM PMSF in a volume four times the volume of the resin. The column was incubated, with shaking, for one hour and then the equilibration buffer was removed from the column. A volume of refolding protein solution, three times the volume of the resin, was poured into the column and incubated on a shaker for 1 hour. The liquid in the column was collected in a sterile tube as the flow through. The column was then washed 2–3 times with a wash buffer. Recombinant protein bound to the resin was eluted with an elution buffer, collected in a sterile tube, and stored at -80° until use.

Results and Discussion

In order to construct the AR1 and AR2 plasmids, we inserted the *rpfB* gene downstream of the GST sequence, between the multi cloning site (MCS) and the terminal sequence (Figure 1). Gene insertion in this area is advantageous because the addition of a terminal sequence to the PCR product is not necessary. With this construct, expression of a protein in accordance with the expected length is more likely.

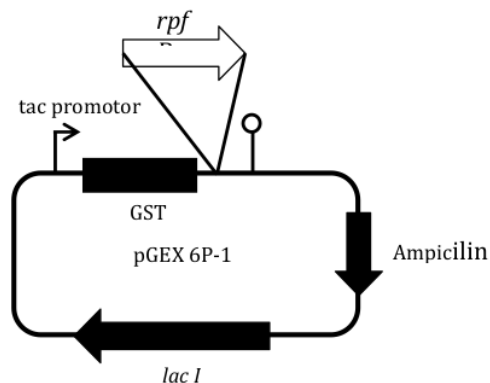


Figure 1. Plasmid Construction to Find AR1 Plasmid

The transformation result produced by colony PCR displayed some positive colonies carrying the *rpfB* gene on a plasmid. Successful DNA transformation of AR1 and AR2 plasmid into *E. coli* BL21 was demonstrated, and elicited the MRB2 and MRB4 strains. Success of the transformation was determined by colony PCR results, which exhibited bands with length as expected (data not shown). All strains and plasmids used in this study are listed in Table 1 and Table 2.

Analysis results for the gene sequencing of *rpfB* gene *M. tuberculosis* strains Beijing, from recombinant plasmids, elicited the presence of mutations outside of the epitopes region when compared to strain H37Rv (Figure 2). RpfB protein have two epitops for CD4⁺ cell T (codon 146-160, codon 251-256) and one epitope for CD8⁺ cell T (codon 66-80) Based on analysis using Genetyx ver.4 software. Even though mutations occurred in cloning, we believe that these mutations will not affect the ability of the protein to stimulate the immune response, since the mutations are out of epitope regions.

To observe RpfB protein expression in the host, we cultured MRB2 and MRB4 in a Luria Bertani (LB) medium. Addition of 1 mM IPTG as an inducer at OD₆₀₀ 0.4 succeeded in inducing RpfB expression, as detected in SDS PAGE (Figure 3). The length of the RpfB protein band was as expected based on analysis in silico [13]. Unexpectedly, the expression of RpfB strain from strain was higher than the H37Rv strain. We speculate that the appearance of this gene mutation may have resulted from changes in the protein conformational, a protein that is normally accepted and overexpressed by *E. coli* but was instead rejected. It will be advantageous to isolate the protein in a large scale. However, this experimental step revealed that the expression of the Rpf protein family of *M. tuberculosis* can be performed in the pGEX system with *E. coli* as a host.

Tabel 1. Bacterial Strain List

Strain	Genotype	Source
<i>M. tuberculosis</i> strain H37Rv		Bacterial stock of Microbiology Department Medical Faculty Universitas Indonesia
<i>M. tuberculosis</i> strain Beijing		Bacterial stock of Pusat Biomedis dan Teknologi Kesehatan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia
<i>E. coli</i> DH5α	FΦ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA</i> argF) ¹¹ U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA</i> ³ <i>pE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Bacterial stock of Microbiology Department Medical Faculty Universitas Indonesia
<i>E. coli</i> BL21pLys	F- <i>ompT hsdS</i> (rB-mB-) <i>gal dcm λ</i> (DE3) <i>pLysS</i> (Camr) (<i>λ</i> (DE3): <i>lacI</i> , <i>lacUV5</i> -T7 <i>gene 1</i> , <i>ind1</i> , <i>sam7</i> , <i>nin5</i>)	Bacterial stock of Microbiology Department Medical Faculty Universitas Indonesia
MRB1 (H37Rv)	<i>E. coli</i> DH5αpGEX6P-1 <i>rpjB</i>	This work
MRB2 (H37Rv)	<i>E.coli</i> BL21pGEX6P-1 <i>rpjB</i>	This work
MRB3 (Beijing)	<i>E. coli</i> DH5αpGEX6P-1 <i>rpjB</i>	This work
MRB4 (Beijing)	<i>E.coli</i> BL21pGEX6P-1 <i>rpjB</i>	This work

Table 2. Plasmid List

Plasmid	Genotype	Source
pGEX 6P-1		Amersham
R1 (H37Rv)	pGEX 6P-1Δ <i>rpjB</i>	This work
R2 (Beijing)	pGEX 6P-1Δ <i>rpjB</i>	This work

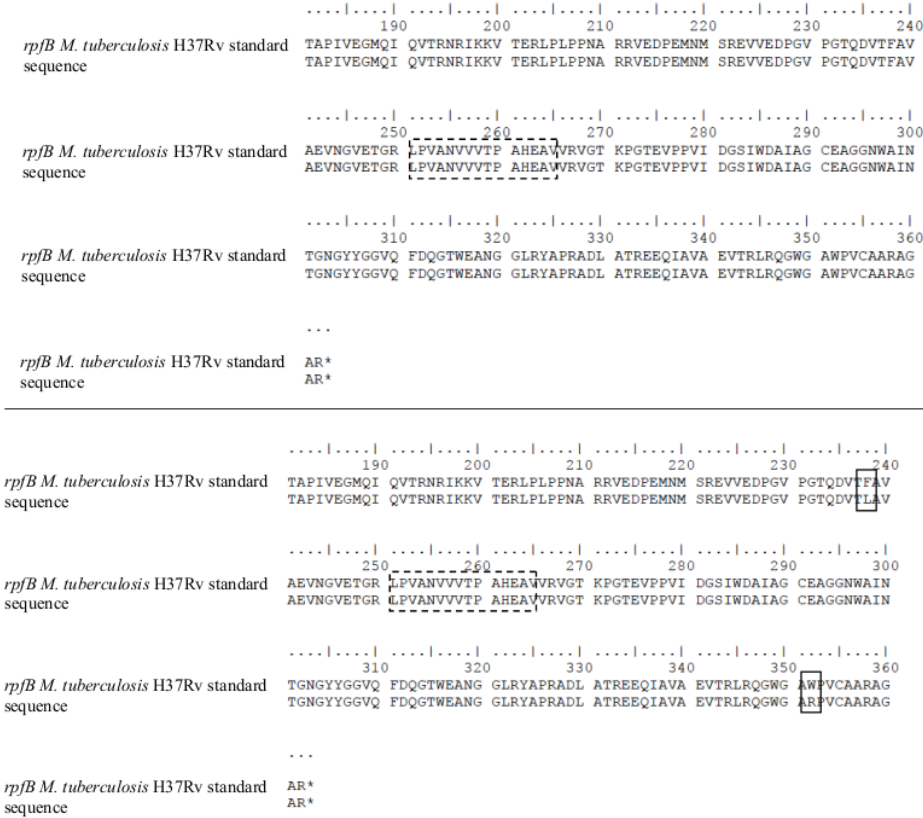


Figure 2. Analysis of *rpjB* Recombinant Sequences Comparing to *M. tuberculosis* H37Rv Standard Sequence

8) examine the expression of RpfB, we performed western blotting with an anti-GST antibody as reporter. The results support previous data that the expressed protein is a fusion between RpfB and GST (Figure 4). The result of this experiment, using pellet and supernatant fractions, demonstrated that the protein was expressed mostly in the pellet. This indicates that the *rpfB* gene may have been translated as inclusion bodies in *E. coli*. To confirm that the protein expression of RpfB was not in inclusion bodies as a result of the high culture incubation temperature (37 °C), we repeated the culture step with incubation temperature variations up to 20 °C and examined the protein expression (data not shown). The result reveals that the RpfB protein consistently translates as inclusion bodies.

RpfB protein isolation, using the solubilization and refolding solution containing urea, transferred the protein originally in the pellet fraction to be in supernatant. Modifying this fraction means that the proteins can be isolated using an affinity column (Figure 5). Although the refolding was successful, the amount of isolated protein was nonetheless not optimal, as RpfB cit can be seen from the amount of target protein observed in the flow through. We speculate that the content of urea in the solubilization and refolding solution possibly blocked the binding of the GST protein to the slurry.

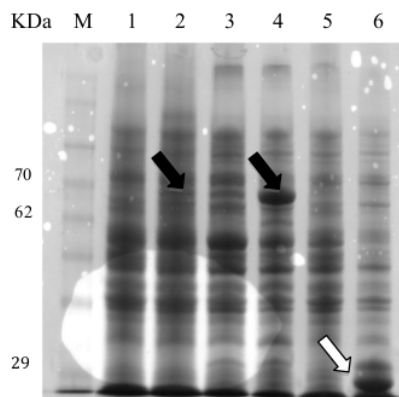
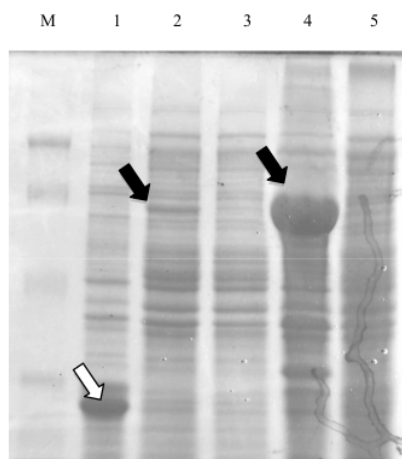


Figure 3. RpfB Expression on SDS PAGE. M = Marker; 1. *E. coli* BL21+pGEX-rpfB (H37Rv) without Induction, 2. *E. coli* BL21+pGEX-rpfB (H37Rv) was Induced by 1 mM IPTG, 3. *E. coli* BL21+pGEX-rpfB (Beijing) without Induction, 4. *E. coli* BL21+pGEX-rpfB (Beijing) was Induced by 1 mM IPTG, 5. *E. coli* BL21+pGEX without Induction, 6. *E. coli* BL21+pGEX was Induced by 1 mM IPTG. Black Arrow Show Expression of GST+RpfB, White Arrow Show Expression of GST. Molecular Weight GST = 26 KDa, GST+RpfB = 64 KDa.

a. SDS PAGE



b. Western blotting

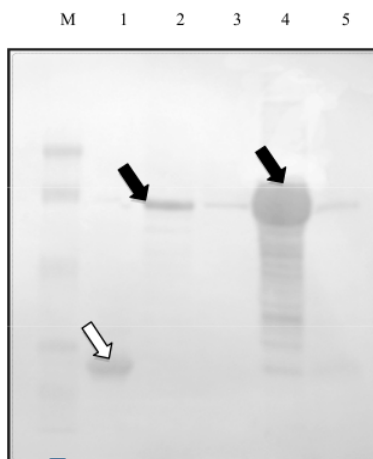


Figure 4. Confirmation of RpfB Protein Expression. a) SDS PAGE: Lane 1, BL21+pGEX 6P-1; Lane 2 BL21+pGEX-rpfB (H37Rv) Pellet, Lane 3 BL21+pGEX-rpfB (H37Rv) Supernatant; Lane 4 BL21+pGEX-rpfB (Beijing) Pellet, Lane 5 BL21+pGEX-rpfB (Beijing) Supernatant. White Arrow Show Expression of GST Protein, Black Arrow Show Expression of GST+RpfB. b). Western Blotting with Antibody-Anti GST: Lane 1, BL21+pGEX 6P-1; Lane 2 BL21+pGEX-rpfB (H37Rv) Pellet, Lane 3 BL21+pGEX-rpfB (H37Rv) Supernatant; Lane 4 BL21+pGEX-rpfB (Beijing) Pellet, Lane 5 BL21+pGEX-rpfB (Beijing) Supernatant. White Arrow Show Expression of GST Protein, Black Arrow Show Expression of GST+RpfB.

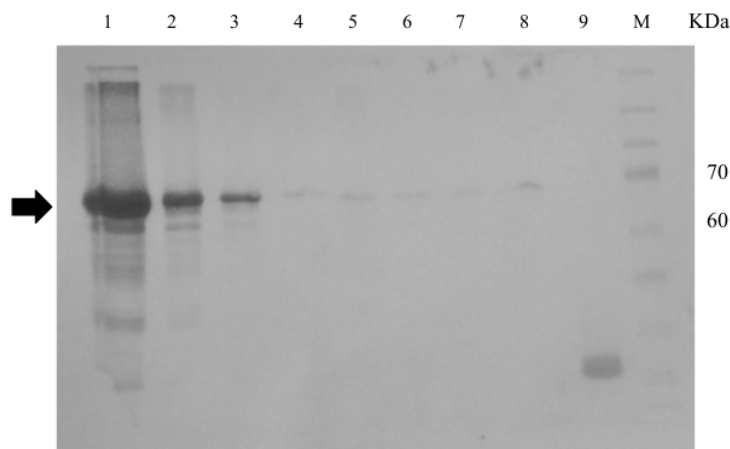


Figure 5. Isolation of RpfB Protein After Solubilizing and Refolding. Lane 1, Supernatant in Urea 8 M; Lane 2, Flow Trough; Lane, 3-4, wash; Lane 5-8, Elute; Lane 9, GST Protein; M = Marker, Black Arrow Show Expression of GST+RpfB.

Further research in protein expression system testing is needed to [22](#) termine an efficient system in protein expression. In this study, we succeeded in cloning and expressing one gene from the *rpf* family, *rpfB*, into the pGEX system. However, analysis of the sequencing results exhibited two point mutations in the gene clone area. These mutations may alter the structure [19](#) the RpfB protein strain from Beijing. Analysis of the epitopes of CD4+ and CD8+ T cells demonstra [17](#) that the amino acid change occurred outside the epitope recognition of CD4+ and CD8+ T cells. Recognition of CD4+ and CD8+ epitopes to be important on TB vaccine study caused by protection against tuberculosis infection is generally mediated by IF γ and IL-12 that are secreted by CD4+ and CD8+ [14](#). All of these mutations likely have no effect on the RpfB antigenicity properties. Changes in two amino acids, as a result of [26](#) e mutations that still allow RpfB protein, can be expressed in *E. coli* BL21. Results of the protein expression were detected by SDS PAGE, and demonstrated that the efficiency of protein expression RpfB in the mutant clone is better than the control strain (H37Rv). We suspect that these two amino acid changes supports the efficiency of the expression of the protein. Further testing is required to better understand the involvement of these mutations in RpfB expression. Nevertheless, we think it is this unexpected finding that will foster protein production for our next study, one in further exploring antigenicity of RpfB protein.

We expected that fusion of RpfB with GST proteins would increase the solubility RpfB. In fact the expression of this protein, always in pellet fraction, indicates that the protein was in inclusion body form. To confirm RpfB protein expression was not in inclusion bodies due to the high incubation temperature (37 °C) or IPTG, we

repeated the culture step with variation of IPTG concentration and incubation temperature variations below 37 °C (data not shown). Variation of IPTG concentration and temperature did not appear to solubilize these proteins, and the results reveal that the RpfB protein is translated as inclusion bodies. We do not have an argument to explain this phenomena, but it is possible that the *tac* promoter in this vector might in [18](#) e overexpression of proteins. Several other factors may result in the formation of inclusion bodies, such as pH level, osmolarity, cofactors, or folding mechanisms. Conversely, high expression levels also induce polypeptide production in higher concentrations and would interact with a similar region causing an inclusion body [15](#). Although it is possible to isolate the target proteins from the purify-native antigen of *M. tuberculosis*, expression of the proteins on the host, such as *E. coli*, will be more efficient and safe [16,17](#). More than that, through this method the target protein can be re-designed or re-assembled with other target proteins [18](#).

Some expression vectors have also been developed and used to obtain the target proteins. The pET system, containing the T7 promoter, has been used for the expression and isolation of *M. tuberculosis* proteins [18](#). This system is very popular, with more than 50% of cases of successful protein expression with other bacteria [19](#). Nevertheless, our other studies demonstrated that protein isolation using this vector is not able to distinguish between the target and non-target protein on a western blot (unpublished data). We suspect an anti-His antibody was cross-reacted with non-target proteins of *E. coli* containing His residue that could not be separated with an affinity column. Research conducted to study the pET system expressed *M. tuberculosis* proteins and show this system has successfully performed expression

and purification of target proteins. When the detection of protein recombinants were observed using mass spectrometry, it is a more sensitive and expensive process that requires more trained people compared to the conventional western blot method that we used [18]. However, there is a successful study that expressed *M. tuberculosis* protein in pDE22 plasmid, inserted with sequences that encode His's-tag protein upstream of the target gene [20]. This study is important information for His use as there is a tag protein where the results differ from our study. Several plasmids are also generally used to express the protein, but have some weaknesses that can be covered by the pGEX system. For example, under the control of the promoter *cspA*, the expression of proteins requires lowering incubation temperature of the cell culture [21], while the expression of the protein under the control of the promoter λ cl⁸⁵⁷ need a temperature up to 42 °C [22,23].

Finally, the pGEX system has proven useful for cloning and expression of *M. tuberculosis* proteins. This system appears suitable for isolating *M. tuberculosis* proteins that form inclusion bodies, and is easily refolded and resolubilized. Our study provides necessary information for the expression and isolation of *M. tuberculosis* proteins. The successful application of the pGEX system and the modified method for protein isolation in this study can be used by other researchers to assess the expression and isolation of other *M. tuberculosis* target proteins. Moreover, isolated protein from this study can then be used for cellular immunogenicity assay to determine the necessary immunogenic properties and can aid in the discovery of new tuberculosis vaccine candidates.

Conclusion

RpfB protein of *M. tuberculosis* was successfully cloned, expressed, and isolated in pGEX system. The expression of RpfB as membrane protein, this target protein was successfully isolated using the urea method.

Ethical clearance. This study is part of a study under ethical clearance from the Ethics Committee of the Faculty of Medicine Universitas Indonesia No. 906/UN2.F1/ETHICS/2014.

Acknowledgments

This research was fund by Hibah Kompetitif DIKTI 2014-2016.

References

- [1] Global tuberculosis report 2013 [internet]. World Health Organization. Available from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf.
- [2] Svenson, K., Kallenius, G., Pawloski, A., Hamasur, B. 2010. Towards new tuberculosis vaccines. *Hum. Vaccin.* 6(4): 309–317.
- [3] Thais, C.A., Kaufmann, S.H.E. 2010. Review, toward of novel vaccines against tuberculosis: current hopes and obstacles. *Yale. J. Biol. Med.* 83(4): 209–215.
- [4] Russell, G.E., Xu, J., Wang, X., Chan, J., Tufarillo, J.M. 2008. A *Mycobacterium tuberculosis* Rpf double-knockout strain exhibits profound defects in reactivation from chronic tuberculosis and innate immunity phenotypes. *Infect. Immun.* 76(9): 4269–4281.
- [5] Kana, B.D., Downing, K.J., Gordhan, B., Vostroktunova, G., Sung, N., Vostroktunova, G., et al. 2008. The resuscitation promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Mol Microbiol.* 67(3): 672–684.
- [6] Yeremee, V.V., Kondratieva, T.K., Rubakova, E.I., Litovskaya, S.N., Kazarian, K.A., Telkov, M.V., et al. 2003. Proteins of the Rpf family: Immune cell reactivity and vaccination efficacy against tuberculosis in mice. *Infect. Immun.* 71(8): 4789–4794.
- [7] Romano, M., Aryan, E., Korf, H., Bruffaerts, N., Franken, C.L., Ottenhoff, T.H., Huygen, K. 2012. Potential of *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factors as antigens in novel tuberculosis sub-unit vaccines. *Microbes. Infect.* 14(1): 86–95.
- [8] D., Zhang, C., Lu, N., Mu, L., He, Y., Xu, L., et al. 2014. Cloning and characterization of Clp protease proteolytic subunit 2 and its implication in clinical diagnosis of tuberculosis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7(9): 5674–82.
- [9] Yang, S., Zhang, F., Kang, J., Zhang, W., Deng, G., Xin, Y., Ma, Y. 2014. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1096 protein: gene cloning, protein expression, and peptidoglycan deacetylase activity. *BMC Microbiol.* 14(1): 174.
- [10] Cantoni, R., Branzoni, M., Labo, M., Riccardi, G. 2008. The MTCY428.08 gene of *Mycobacterium tuberculosis* codes for NAD⁺ synthetase. *J. Bacteriol.* 180(12): 3218–3221.
- [11] Aldous, W.K., Founder, J.I., Cloud, J.L., Woods, G.L. 2005. Comparison of Six Methods of Extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from Processed Sputum for Testing by Quantitative Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 43(5): 2471–2473.
- [12] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [13] *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv GenoList browser [internet]. Institute Pasteur, France. 1999–2014. Available from: <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/index.html>.

- [14] Caragol, I., Casanova, J.L. 2003. Inherited disorders of the Interleukin-12/Interferon-gamma axis: Mendelian predisposition to mycobacterial disease in man. *Immunol.* 22(3): 263-276.
- [15] Rosano, G.R., Ceccarelli, E.A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers Microbiol.* 5(172): 1-17.
- [16] Ihssen, J., Kowarik, M., Diletto, S., Tanner, C., Wacker, M., Thöny-Meyer, L. 2010. Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli*. *Microb. Cell. Fact.* 9: 61.
- [17] Jong, W.S.P., Sopova, Z., de Punder, K., Hagen-Jongman, C.M., Wagner, S., Wickström, D., de Gier, J.W., Andersen, P., van der Wel, N.N., Luijck, J. 2012. A structurally informed autotransporter platform for efficient heterologous protein secretion and display. *Microb. Cell. Fact.* 11: 85.
- [18] Luciano, P., Manuela, C., Caterina, T., Elisa, B., Francesca, M., Massimo, A., Marco, T., Flavia, M., Loredano, P. 2013. Optimizing *Escherichia coli* as a protein expression platform to produce *Mycobacterium tuberculosis* immunogenic proteins. *Microbiol. Cell. Fact.* 12(1): 115.
- [19] Graumann, K., Premstaller, A. 2016. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol. J.* 1(2): 164-186.
- [20] Xue, Y., Bai, Y., Gaob, X., Jiang, H., Wang, L., Gao, H., Xu Z. 2012. Expression, purification and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* RpfE protein. *J. Biomed. Res.* 26(1): 17-23.
- [21] Vasina, J.A., Peterson, M.S., Baneyx, F. 1998. Scale-up low-temperature inducible cspA promoter system. *Biotechnol. Prog.* 14(5): 714-721.
- [22] Menart, V., Jevsevar, S., Vilar, M., Trobis, A., Pavko, A. 2003. Constitutive versus thermo inducible expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* based on strong PR, PL promoters from phage lambda. *Biotechnol. Bioeng.* 83(2): 181-190.
- [23] Valdez-Cruz, N.A., Caspeta, L., Perez, N.O., Ramirez, O.T., Trujillo-Roldan, M.A. 2010. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microb. Cell. Fact.* 9: 18.

Optimization of pGEX System to Express and Isolate Mycobacterium tuberculosis Inclusion Body Protein in Combining with Modified Refolding Method

ORIGINALITY REPORT

11%	7%	9%	0%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	philpapers.org Internet Source	1%
2	Mariana Susilowati, Hajrial Aswidinnoor, Wening Enggarini, Kurniawan Rudi Trijatmiko. "Identification of A Major Quantitative Trait Locus for Grain Weight In Rice Using Microsatellite Marker", Makara Journal of Science, 2017 Publication	1%
3	mafiadoc.com Internet Source	1%
4	Bavesh Davandra Kana, Valerie Mizrahi. "Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling", FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2010 Publication	1%
5	repository.lib.cuhk.edu.hk Internet Source	1%

6

www.mdpi.com

Internet Source

1 %

7

elifesciences.org

Internet Source

<1 %

8

Bun-ichiro ONO, Masashi KUBOTA, Hiroko KIMIDUKA, Hiroshi KAWAMINAMI et al. "Production of a Polymer-Forming Fusion Protein in Strain BL21 ", Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014

Publication

<1 %

9

Chakravorty, S., H. Kothari, B. Aladegbami, E. J. Cho, J. S. Lee, S. S. Roh, H. Kim, H. Kwak, E. G. Lee, S. H. Hwang, P. P. Banada, H. Safi, L. E. Via, S.-N. Cho, C. E. Barry, and D. Alland. "Rapid, High-Throughput Detection of Rifampin Resistance and Heteroresistance in Mycobacterium tuberculosis by Use of Sloppy Molecular Beacon Melting Temperature Coding", Journal of Clinical Microbiology, 2012.

Publication

<1 %

10

Iria Uhía, Kerstin J. Williams, Vahid Shahrezaei, Brian D. Robertson. "Mycobacterial Growth", Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2015

Publication

<1 %

11

microbialcellfactories.biomedcentral.com

Internet Source

<1 %

- | | | |
|----|--|------|
| 12 | Huy Hoa Hoang, Pei-Chi Wang, Shih-Chu Chen. "Recombinant resuscitation-promoting factor protein of <i>Nocardia seriolae</i> , a promissing vaccine candidate for largemouth bass (<i>Micropterus salmoides</i>)", <i>Fish & Shellfish Immunology</i> , 2021
Publication | <1 % |
| 13 | Rong, J.. "Large-scale manufacture and use of recombinant VP2 vaccine against infectious bursal disease in chickens", <i>Vaccine</i> , 20071114
Publication | <1 % |
| 14 | repository.nwu.ac.za
Internet Source | <1 % |
| 15 | dugi-doc.udg.edu
Internet Source | <1 % |
| 16 | <i>Methods in Molecular Biology</i> , 2014.
Publication | <1 % |
| 17 | openaccess.leidenuniv.nl
Internet Source | <1 % |
| 18 | "Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability", Springer Science and Business Media LLC, 2016
Publication | <1 % |
| 19 | Elsa du Bruyn, Cari Stek, Remy Daroowala, Qonita Said-Hartley et al. "Communicable and non-communicable co-morbidities and the | <1 % |

presentation of COVID-19 in an African setting
of high HIV-1 and tuberculosis prevalence",
Cold Spring Harbor Laboratory, 2021

Publication

20

Hussain, Afzal, Sandeep Kumar Singh, Priya Ranjan Prasad Verma, Neeru Singh, and Farhan Jalees Ahmad. "Experimental design-based optimization of lipid nanocarrier as delivery system against Mycobacterium species: in vitro and in vivo evaluation", Pharmaceutical Development and Technology, 2016.

Publication

<1 %

21

hss.ulb.uni-bonn.de

Internet Source

<1 %

22

office2.jmbfs.org

Internet Source

<1 %

23

www.lib.kobe-u.ac.jp

Internet Source

<1 %

24

R Kavitha, R Verma. "Cloning and molecular characterisation of resuscitation promoting factor-like gene from Mycobacterium avium subspecies avium", Indian Journal of Medical Microbiology, 2016

Publication

<1 %

25

www.nrcresearchpress.com

Internet Source

<1 %

26

E. -J. Kim, S. -K. Yoo. "Cell surface display of hepatitis B virus surface antigen by using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein", Letters in Applied Microbiology, 1999

Publication

<1 %

27

Jicai Bi, Honghai Wang, Jianping Xie. "Comparative genomics of NAD(P) biosynthesis and novel antibiotic drug targets", Journal of Cellular Physiology, 2011

Publication

<1 %

28

jcm.asm.org

Internet Source

<1 %

Exclude quotes On

Exclude matches Off

Exclude bibliography On

The potential of traditional balinese spices against the growth of *Salmonella* sp in vitro

by B 4

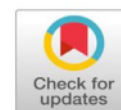
Submission date: 15-May-2021 06:29AM (UTC+0700)

Submission ID: 1586355774

File name: Jurnal_Teknologi_Laboratorium_2020.pdf (490.02K)

Word count: 3407

Character count: 18810



Original Research



The potential of traditional balinese spices against the growth of *Salmonella sp* in vitro

I Nyoman Jirna^a, I Gede Sudarmanto^b, Surya Bayu Kurniawan^c, Gusti Ayu Made Ratih^d,
Burhannuddin Rasyid^e

Department of Medical Laboratory Technology, Poltekkes Kemenkes Denpasar, Indonesia

^a Email address: nyomanjirna@gmail.com

^b Email address: igedesudarmanto@yahoo.com

^c Email address: suryabayu.kurniawan@yahoo.com

^d Email address: iga_ratihkurada@yahoo.com

^e Email address: boerhannuddin@gmail.com

HIGHLIGHTS

Traditional Balinese have antimicrobial potential.

ARTICLE INFO

Article history

Received Date: April 02nd, 2020

Revised Date: May 24th, 2020

Accepted Date: June 09th, 2020

Keywords

Traditional Balinese spices

Antimicrobial potential

Salmonella sp

ABSTRACT

Prevention by utilizing medicinal plants can be used as an alternative treatment. This study aims to identify active antimicrobial substances and test the antimicrobial potential of traditional Balinese spices, namely Basa Selem, Basa Gede, Basa Wangen, Basa Bawang Jahe, and Basa Rajang against *Salmonella sp* bacteria *in vitro*. The True-experimental method with Posttest only-control design was used in this study, by intervening in the treatment group as well as the presence of positive and negative controls. Maceration method with 96% EtOH solvent was used to extract active substances and identify the levels of antimicrobial active substances. The TLC Spectrophotodensitometer instrument and the diffusion method (discs) were used to test antimicrobial potential. Data analysis was performed using the one-way ANOVA test. All five samples showed flavonoids, alkaloids, tannins and phenols in qualitative tests. Based on quantitative test results of five samples, the highest compound content obtained in Basa Wangen (6.66 mg/ml of tannins), Basa Gede (3.74 mg/ml of flavonoids), Basa Bawang Jahe (2.49 mg/ml of tannins), Basa Selem (2.87 mg/ml of tannin), and Basa Rajang (6.96 mg/ml of flavonoids). There are differences in the antimicrobial potential of various types of traditional Balinese spices against the growth of *Salmonella sp* in vitro (sig = 0.037). The traditional Balinese spices have the antimicrobial potential of the intermediate category with a range of inhibition (16-20 mm) based on the NCCLS standard.

[This is an open-access article under the CC-BY-SA license.](#)



*Corresponding Author:

I Nyoman Jirna

Group Research in Department of Medical Laboratory Technology, Health Polytechnic of Denpasar, Bali, Indonesia

Email: nyomanjirna@gmail.com

Phone: +62361 710527



1. INTRODUCTION

Indonesia has a diversity of cultures along with the development of various types of food with diverse flavours as well. Spices are often used in various culinary regions in Indonesia as a cooking ingredient. In addition to increasing food flavour, added spices can also increase product durability and also product safety for consumption. Increased shelf life and safety of food products added to spices are caused by the ability of spices to inhibit the growth of bacteria present in food.¹ Many spices are also synergists when combined, and those spices exhibit greater antibacterial effects than when each is used alone.²

Spices are also believed to be beneficial for health because they contain many bioactive compounds that function as antimicrobials, antioxidants, antidiabetic, antitumor, and other functions that are very beneficial for maintaining health. For this reason, spices are widely developed for traditional medicine because they are believed not to cause harmful side effects¹. The food ingredients made from spices are processed in a simple way. Traditional spices are very beneficial in the absence of chemicals such as monosodium glutamate (MSG), which are commonly used as flavouring ingredients.³ The use of traditional spices which is a collection of various spices in making Balinese sausages (Urutan) functions as a flavouring, preservative, antioxidant and antimicrobial.³

The content of essential oils in spices can be used to inhibit the growth of bacteria in food. The results of other studies show that spices produce Allicin (the active substance of garlic) can penetrate quickly into different parts of the cell and cause biological effects.¹ Other ingredients that are often used in traditional herbs are garlic, mustard, cloves and ginger. Cloves have the highest antibacterial activity followed by garlic, while mustard and ginger show smaller antibacterial activity.¹ The spices are also found in traditional Balinese spices such as Basa Wangen, Basa Gede, Basa Bawang Jahe, Basa Selem, and Basa Rajang. This research was conducted to study the antimicrobial potential of traditional Balinese spices against the growth of *Salmonella sp* in vitro.

2. MATERIAL AND METHOD

There are five types of traditional Balinese spices such as Basa Wangen, Basa Gede, Basa Bawang Jahe, Basa Selem, and Basa Rajang. The total number of samples from this study was 56 samples, where there were eight times replications from 5 treatment groups with one positive control and one negative control⁴. Antimicrobial potential was evaluated by measuring inhibition zone diameters, using 96% EtOH as a negative control and Ciprofloxacin 5 µg as a positive control. Maceration method with 96% EtOH solvent was used to extract active substances and identify the levels of antimicrobial active substances. The TLC Spectrophotodensitometer instrument and the diffusion method (discs) were used to test antimicrobial potential. The True-experimental method with Posttest only-control design was used in this study, by intervening in the treatment group as well as the presence of positive and negative controls. Data analysis began with the Kolmogorov Smirnov test, then One Way ANOVA (Analysis of Variance) test was used to determine the inhibition zone of various types of traditional Balinese spices extract, then compared to the NCCLS table (National Committee for Clinical Laboratory Standards) to determine the most potential types of traditional Balinese spices as antimicrobials against the growth of *Salmonella sp*.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The results of qualitative tests by phytochemical screening on the content of antibacterial compounds of traditional Balinese spices obtained the following results ([Table 1](#)).

Table 1. Qualitative Test Results of Antibacterial Compounds from Traditional Balinese Spices Extracts

No	Spices Samples	Antibacterial Compounds Test Results				
		Alkaloids	Saponin	Phenol	Flavonoids	Tannins
1	Basa Wangen	+	-	+	+	+
2	Basa Gede	+	-	+	+	+
3	Basa Bawang Jahe	+	-	+	+	+
4	Basa Selem	-	-	+	+	+
5	Basa Rajang	-	-	+	+	+

Noted: (+) detected; (-) not detected

Qualitative test results indicate there is a positive compound; it is suspected that the compound has antibacterial activity (phenol, flavonoid, and tannin compounds). Quantitative tests were continued to determine the levels of compounds suspected to have antibacterial activity (total phenols, flavonoids and tannins) (table 2).

Table 2. Quantitative Test Results of Traditional Balinese Spices Extracts Antibacterial Compounds

No	Spices Samples	Antibacterial Compounds		
		Phenol (mg/mL.GAE)	Flavonoids (mg/mL.RE)	Tannins mg/mL.GAE)
1	Basa Wangen	3.39	3.27	6.66
2	Basa Gede	1.83	3.74	1.35
3	Basa Bawang Jahe	2.14	2.46	2.49
4	Basa Selem	2.42	1.96	2.87
5	Basa Rajang	3.35	6.96	2.35

Noted: GAE: Gallic Acid Equivalents; RE: Rutin Equivalents

In this study, the inhibitory test of Balinese traditional spices concentrations of 100% (1 mg/ml) was carried out on the growth of *Salmonella sp.* bacteria using 96% EtOH as a negative control and Ciprofloxacin 5 µg as a positive control. The positive control showed a zone of inhibition until the eighth replication. The positive zone inhibition zone values obtained were not very different. The mean inhibition zone diameter obtained was 31.88 mm (Table 3).

Table 3. Inhibition Zone of Traditional Balinese Spices on the growth of *Salmonella sp.* in Vitro

Replications	Inhibition zone					Positive control	Negative control
	Basa Selem (1 mg/ml)	Basa Gede (1 mg/ml)	Basa Wangen (1 mg/ml)	Basa Bawang Jahe (1 mg/ml)	Basa Rajang (1 mg/ml)		
1	20	20	21	17	22	32	0
2	15	21	18	18	19	31	0
3	20	19	19	17	17	33	0
4	14	18	16	15	19	32	0
5	15	21	16	15	18	34	0
6	18	19	18	19	18	30	0
7	16	18	21	19	19	32	0
8	19	20	19	18	21	31	0
Mean ± SD	17.13 ± 2.42	19.5 ± 1.19	18.5 ± 1.92	17.25 ± 1.58	19.13 ± 1.57	31.88 ± 1.25	0.0 0.00

Noted: SD: Standard Deviation

The mean diameter of negative controls showed there was none inhibitory activity of *Salmonella sp.* bacteria growth, starting from replication one to replication eight, the inhibition zone diameter of negative control obtained was 0 mm.

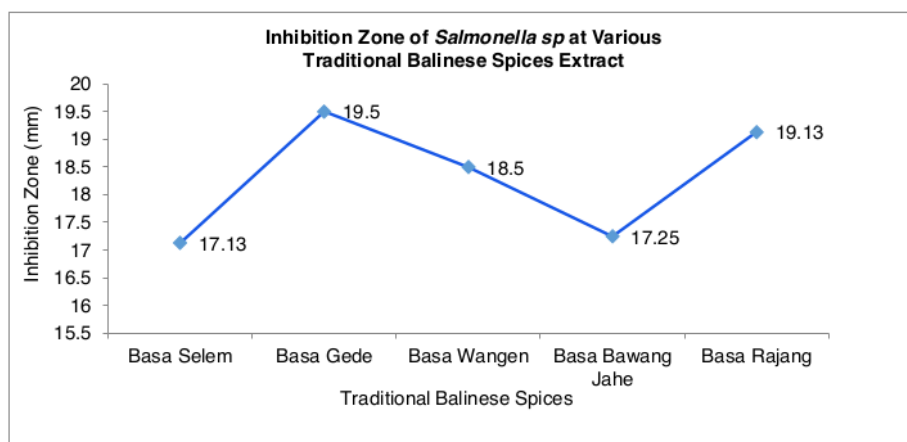


Figure 1. Inhibition Zone Differences of Various Traditional Balinese Spices Extract

Based on the results of the current study, none of the traditional Balinese spices was effective against the growth of *Salmonella sp* (when compared to the NCCLS table). Inhibitory zone diameters formed in various traditional Balinese spices are in the intermediate category (16-20 mm). One Way ANOVA test results (using software SPSS 16.00) obtained sig value was 0.037 (<0.05). The results showed there was a differences inhibition zone of *Salmonella sp* in various Balinese traditional spices with concentration 1 mg/ml. Based on these results, there are differences in the antimicrobial potential of various types of traditional Balinese spices extracts against *Salmonella sp*. The differences in inhibitory activity from various types of traditional Balinese spices extracts was analyzed by LSD (Least Significant Difference) test. The LSD test showed that p-value was 0.000 ($p < \alpha$); there were significant differences in the effectiveness of biodesinfektant at various traditional Balinese spices extracts against *Salmonella sp*.

The inhibitory test was conducted to determine the antibacterial potential of traditional Balinese spices against *Salmonella sp*. bacteria. Traditional Balinese spices extract was obtained through the maceration method using 96% EtOH, and the extract obtained then tested for its inhibitory activity. Based on the results of the observation, all the various traditional Balinese spices extract have inhibition on the growth of *Salmonella sp*. bacteria. Inhibition can be seen from the clear zones that formed around the disk containing traditional Balinese spices extract. In this method, the extract on the disk will diffuse, and the active substances contained in it will inhibit bacterial growth. The wider the clear zone formed shows, the more significant inhibitory activity. In this study, 96% ethanol was used as a negative control to determine whether there is an effect of ethanol on the growth of *Salmonella sp*. bacteria which is also used as a solvent in the extraction process. The mean diameter of negative controls showed there is no inhibitory activity of *Salmonella sp*. bacteria growth with a measured value of 0.00 mm. The same thing was also obtained from the study *in vitro* inhibitory activity of ethanolic fruit extract from *Averrhoa bilimbi* L. against *Streptococcus pyogenes* bacteria.⁵

In this study, the positive controls used Ciprofloxacin antibiotic discs as work controls. Ciprofloxacin is a broad-spectrum antibiotic that is widely used to treat human and animal diseases, which Ciprofloxacin is a broad-spectrum antibiotic of the fluoroquinolone class. Ciprofloxacin is active against some Gram-positive and many Gram-negative bacteria. Ciprofloxacin has rapidly bactericidal activity and high potency. Relatively long post-antibiotic effect.⁵ The mean diameter of the inhibition zone from Ciprofloxacin antibiotic discs was 31.88 mm. These results are according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), where

Ciprofloxacin belongs to the sensitive category. It is indicated that the bacterial isolates used and the procedures carried out in this study are confirmed with testing standards for inhibiting antibacterial substances.⁶ This study also shows that Ciprofloxacin is still effective against *Salmonella sp.* bacteria.⁷

The results of this study show that traditional Balinese spices extract (1 mg/ml) were able to inhibit the growth of *Salmonella sp.* Bacteria which was characterized by the formation of clear zones around the discs. This study also shows that different diameter inhibition zones are formed for each traditional Balinese spices extract. It might be caused the differences of spices content and the number of spice compositions (which contain antimicrobial compounds) in traditional Balinese spices. The result of the largest inhibition zone was produced by Basa Gede, which was equal to 19.50 mm, among the other traditional Balinese spices. It might be caused the Basa Gede consists of spice components that are more complete than other spices. Basa Gede contains galangal, ginger, turmeric, shallots, garlic, pepper, coriander, chilli, cumin leaves, bay leaves, Wangen leaves, and lemongrass. The beneficial properties in herbs and spices are due to the presence of phytochemicals. The major phytochemical classes associated with herbs and spices include a diverse array of compounds such as terpenes and terpene derivatives.⁸ Other compounds include glycosides, alkaloids like piperine, chavicine, capsaicinoids (pepper fruit), saponins like trigonelline, allyl sulphur, adenosine, (onions and garlic), quercetin (onions), curcumin (turmeric) and isothiocyanates (cruciferous vegetables).⁹ Qualitative test results by phytochemical screening indicate the presence of alkaloids, flavonoids, phenols, and tannins contained in the extract. Flavonoid is an active substance which is a class of hesperidin compounds and causes damage to bacterial cell wall permeability, microsomes, and lysosomes as a result of interactions between flavonoids and bacterial DNA.¹⁰

Phenol is one of the compounds contained in essential oils which has a broad spectrum of bioactivity, owing to the presence of several active ingredients or secondary metabolites, which work through various modes of action.¹¹ Essential oils contain a variety of volatile molecules such as terpenes, phenolic-derived aromatic and aliphatic components.¹² Phenolic compounds are generally claimed to be bacteriostatic. Moreover, the antimicrobial action of phenols is related to their ability to denature proteins, as well as to produce a loss of membrane integrity resulting in leakage of essential intracellular constituents such as potassium cation, inorganic phosphate, pentoses, nucleotides and nucleosides, and proteins. The mechanisms thought to be responsible for phenolic toxicity to microorganisms include enzyme inhibition by the oxidized compounds, possibly through reaction with sulfhydryl groups or through more non-specific interactions with the proteins.¹³

Tannins (commonly referred to as tannic acid) are water-soluble polyphenols that are present in many plant foods. Tannin toxicity for fungi, bacteria and yeasts is reviewed and compared to the toxicity of related lower molecular weight phenols. The dependence of toxicity on tannin structure is examined.¹⁴ The different mechanisms proposed so far to explain tannin antimicrobial activity include inhibition of extracellular microbial enzymes, deprivation of the substrates required for microbial growth or direct action on microbial metabolism through inhibition of oxidative phosphorylation.¹⁵

The formation of different inhibitory zones due to variations in the types of constituent variations and differences in the number of components and storage conditions.¹¹ The freshness index of the ingredients of traditional Balinese spices can be seen from the texture of the material, the overall colour of the material, the basic colour of the skin, the colour of the contents of the material, the hardness (firmness) of the material, the content of dissolved sugar (solid soluble content), acidity, and the concentration of ethylene. Harvesting of traditional Balinese spices ingredients which is done earlier or rather late can affect the quality of spices, such as colour, texture, taste and aroma as well as the content of chemical compounds especially those that are harvested earlier or later. This influences changes in chemical and physical properties during

maturation because after harvesting the material still performs metabolic reactions. The optimum temperature for storing materials is 5-10°C. If the temperature is too low, it can cause damage to the material (chilling injury). Other factors that affect the inhibition zone diameter are the incubation temperature, incubation time, tool sterility, contamination, the turbidity of the bacterial suspension, media thickness, and disk disc distance.¹⁶ However, these factors have been controlled, so these factors do not have a significant influence on the results of this study.

This research can be continued by using modifying formulas from traditional Balinese spices, so the concentration of antimicrobial compounds contained becomes higher. This is expected to increase the inhibitory growth of *Salmonella sp.* bacteria.

4. CONCLUSION

Based on the results of the research, it can be concluded that the traditional Balinese spices contain antibacterial compounds such as flavonoids, alkaloids, phenols (3.35 mg/ml) and flavonoids (6.96 mg/ml) and tannin (6.66 mg/ml) with antimicrobial potential categories was intermediate (inhibitory range was 16-20 mm). There are differences in the antimicrobial potential of various types of traditional Balinese spices against the growth of *Salmonella sp.* bacteria in vitro with sig value was 0.037 (<0.05). The result of the largest inhibition zone was produced by Basa Gede, which was equal to 19.50 mm, among the other traditional Balinese spices.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors reported no potential conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENT

Researchers thanks to all team and to Directure of Poltekkes Kemenkes Denpasar.

FUNDING INFORMATION

This research was funded by the RISBINAKES fund (research for the development of health personnel) of the DIPA Poltekkes Denpasar.

REFERENCES

1. Rahayu NPN, Kawuri R, Suriani NL. Uji Keberadaan Staphylococcus aureus pada Sosis Tradisional (Urutan) yang Beredar di Pasar Tradisional di Denpasar, Bali. *Simbiosis J Biol Sci.* 2014;2(1).
2. Billing J, Sherman PW. Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q Rev Biol.* 1998;73(1):3-49. doi:10.1086/420058.
3. Antara NS, Wartini M. Senyawa Aroma Dan Citarasa (Aroma and Flavor Compounds). *Trop Plant Curric Proj.* 2016;(October):1-71.
4. Hanafiah KA. *Rancangan Percobaan Aplikatif*. Jakarta: PT. RajaGrafindo Persada; 2005.
5. Dewi P, Ratih GA, Burhannuddin B, Sudarmanto G. In vitro Inhibitory Activity of Ethanolic Fruit Extract from Averrhoa bilimbi L. against Streptococcus pyogenes Bacteria. *Heal Notions.* 2019;3(1):13-17. doi:10.33846/hn.v3i1.276.
6. CLSI. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing. In: Megan L, M. Tertel, eds. 27th ed. West Valley Road USA; 2017.
7. Zeiler HJ, Grohe K. Summary for Policymakers. In: Intergovernmental Panel on Climate Change, ed. *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis*. Vol 1. Cambridge: Cambridge University Press; 1986:1-30. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
8. Lampe JW. Spicing up a vegetarian diet: chemopreventive effects of phytochemicals. *Am J Clin Nutr.* 2003;78(3):579S-583S. doi:10.1093/ajcn/78.3.579S.
9. Keservani RK, Kesharwani RK, Vyas N, Jain S, Raghuvanshi R, Sharma AK. Nutraceutical and Functional Food As Future Food: A Review. *Der Pharm Lett.* 2010;2(1):106-116.

10. Rijayanti RP, Luliana S, Trianto HF. In vitro Antibacterial Activity test Of Ethanol Extracts Bacang mango (*Mangifera foetida* L.) Leaves Against *Staphylococcus aureus*. *Naskah Publ Univ Tanjungpura*. 2014;1(1):10-12.
11. Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. The *Artemisia* L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. *Molecules*. 2012;17(3):2542-2566. [doi:10.3390/molecules17032542](https://doi.org/10.3390/molecules17032542).
12. Blagojević P, Radulović N, Palić R, Stojanović G. Chemical Composition of the Essential Oils of Serbian Wild-Growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. *J Agric Food Chem*. 2006;54(13):4780-4789. [doi:10.1021/jf060123o](https://doi.org/10.1021/jf060123o).
13. Furneri PM, Bisignano G. Usage of Hydroxytyrosol for Antimycoplasmal Activity. In: Preedy VR, Watson RR, eds. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Elsevier; 2010:1283-1288. [doi:10.1016/B978-0-12-374420-3.00142-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00142-X).
14. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 1991;30(12):3875-3883. [doi:10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L).
15. Chung K-T, Wong TY, Wei C-I, Huang Y-W, Lin Y. Tannins and Human Health: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1998;38(6):421-464. [doi:10.1080/10408699891274273](https://doi.org/10.1080/10408699891274273).
16. Keskin D, Toroglu S. Studies on antimicrobial activities of solvent extracts of different spices. *J Environ Biol*. 2011;32(2):251-256. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21882663>.

SHORT BIOGRAPHY

I Nyoman Jirna

Does research in Microbiology. Current research interest include identification of *Aspergillus* species in Tumeric Jamu. <https://scholar.google.co.id/citations?user=YzOjKmkAAAAJ&hl=en>

The potential of traditional balinese spices against the growth of Salmonella sp in vitro

ORIGINALITY REPORT

5%

SIMILARITY INDEX

2%

INTERNET SOURCES

4%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

MATCH ALL SOURCES (ONLY SELECTED SOURCE PRINTED)

< 1%

★ Nehal Salahuddin, Badr Badr, Rehab Abdeen.

"Synthesis and antimicrobial activity of the Schiff base from polyoxyalkylene-montmorillonite nanocomposites and aldehydes", Polymer Composites, 2012

Publication

Exclude quotes On

Exclude bibliography On

Exclude matches Off

In vitro Inhibitory Activity of Ethanolic Fruit Extract from Averrhoa bilimbi L. against Streptococcus pyogenes Bacteria

by B 2

Submission date: 15-May-2021 06:27AM (UTC+0700)

Submission ID: 1586355097

File name: Health_Notions_1_Jan_2019.pdf (248.79K)

Word count: 3039

Character count: 17067



In vitro Inhibitory Activity of Ethanolic Fruit Extract from *Averrhoa bilimbi* L. against *Streptococcus pyogenes* Bacteria

¹ Puspita Dewi¹, Gusti Ayu Ratih^{2(CA)}, Burhannuddin³, I Gede Sudarmanto⁴

¹Department of Medical Laboratory Technology, Health Polytechnic of Denpasar, Indonesia; boerhan28@gmail.com

²Department of Medical Laboratory Technology, Health Polytechnic of Denpasar; ³Postgraduate Program of Pharmacy, Airlangga University, Indonesia; iga_ratihkurada@yahoo.com (Corresponding Author)

³Department of Medical Laboratory Technology, Health Polytechnic of Denpasar, Indonesia

⁴Department of Medical Laboratory Technology, Health Polytechnic of Denpasar, Indonesia

ABSTRACT

Averrhoa bilimbi L., popularly known as belimbing wuluh, is a common plant used as traditional medicine and cooking ingredients in Indonesia. *Averrhoa bilimbi* fruit contains many active substances as antibacterial such as tannin, formic acid, flavonoids, saponins, per¹⁶des, and triterpenoids. *Streptococcus pyogenes* is a pathogenic bacteria that can cause respiratory infections. This study was carried out to investigate the inhibitory activity of *Averrhoa bilimbi* L. fruit extract at various concentrations on the growth of *Streptococcus pyogenes*. This study was a true experimental with post test only control design. The inhibitory activity was assessed by the Kirby-Bauer's disc diffusion method with four different extract concentrations (20%, 40%, 60%, 80%), 96% EtOH as negative control, and Amoxicillin antibiotic as positif control. The EtOH extract showed the mean diameter of inhibition zone of 20% extract was 11.43 mm (strong), 40% extract was 19.13 mm (strong), 60% extract was 24.58 mm (very strong), 80% extract was 30.99 mm (very strong), and the negative control (96% EtOH) was 0.00 mm. Least Significant Difference test showed there were significant different of inhibition zone in each extract concentrations of *Averrhoa bilimbi* L. against *Streptococcus pyogenes* with the strongest inhibitory activity is 80% extract concentration.

Keywords: *Averrhoa bilimbi*, Inhibitory activity, *Streptococcus pyogenes*

INTRODUCTION

Background

Averrhoa bilimbi (Family Oxalidaceae) is popularly known as belimbing wuluh, is a common plant used as traditional medicine and cooking ingredients in Indonesia. This plant is widespread across Indonesia, Malaysia and as exotic in Argentina, Australia, Brazil, Colombia, Cuba, Ecuador, Guyana, India, Jamaica, Myanmar, Philippines, Puerto Rico, Singapore, SriLanka, Surinam, Tanzania, Thailand, Trinidad & Tobago, US, and Venezuela. Fruit ellipsoid, obovoid or nearly cylindrical, faintly 5-sided, 4-10 cm long, capped by a thin, starshaped calyx at the stem-end and tipped with 5 hair like floral remnants at the apex. Crispy when unripe, the fruit turns from bright green to yellowish-green, ivory or nearly white when ripe and falls to the ground. The outer skin is ¹³ssy, very thin, soft, juicy and extremely acid¹. ³

A. bilimbi has been used in the traditional medicine for the treatment of a variety of ailments. Infusions and ⁸coctions of the leaves are used as an antibacterial, antiscorbutic, astringent, postpartum protective medicine, in the treatment of fever, inflammation of the rectum, and diabetes². Fruit juice is used in the treatment of scurvy, bilious colic, whooping cough, hypertension, obesity, and diabetes^{3,4,5}. Several studies have found that *A. bilimbi* contains high amount of bioactive compounds. Preliminary phytochemical studies of the fruit extracts using chemical methods and thin layer chromatography revealed the presence of carbohydrates, proteins, amino acids, flavonoids, tannins, bitter principles, essential oil, valepotriates, coumarin, and terpenes^{6,7}. The bark extracts of *A. bilimbi* revealed moderate antibacterial activity against some microorganisms and the phytochemical investigation suggested the presence of flavonoids, saponins and alkaloids⁸. The leaves and fruit extract of *A.*

bilimbi also contains a number of flavonoids with the type of luteoin. This compound, together with apigenin is known to be effective enough to inhibit the growth of several types of bacteria such as *Bacillus cereus* and *Corney bacterium diptheria*⁽⁹⁾. The fruits are also rich in Vitamin C and oxalic acid^(6,7). The previously study also reported that the content of oxalic acid in *Averrhoa* species can become a potent source of antioxidant and antimicrobial against *S. aureus*⁽¹⁰⁾. The aqueous and chloroform extracts of *A. bilimbi*'s leaves and fruits (100 mg/ml) showed a positive antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus vulgaris*, and *Kocuria rhizophila*⁽¹¹⁾. In another study, fruits and roots extracts of *A. bilimbi* were also found to exhibit the positive activity against *Mycobacterium tuberculosis* with MIC of 1600 µg/ml⁽¹²⁾. The previously study also reported that EtOH extract of *A. bilimbi* fruit inhibits the growth of *Streptococcus mutans* with the mean diameter of inhibition zone formed at concentration of 25% was 10.1 mm, 50% was 15.1 mm, 75% was 18.1 mm, and 100% was 20.1 mm⁽¹³⁾.

11

Purpose

The aim of current study was to analysis the inhibitory activity of *Averrhoa bilimbi* L. fruit extract at various concentrations on the growth of *Streptococcus pyogenes* by using *in vitro* techniques. The concentration variations used in this study were 20%, 40%, 60%, and 80%. This concentration variation is based on the preliminary test that has been carried out. Concentration of 20% extract produces a zone of inhibition of 10 mm, so the concentrations of 20%, 40%, 60%, and 80% are chosen in this study.

METHODS

The inhibitory activity was assessed by the Kirby-Bauer's disc diffusion method with four different extract concentrations (20%, 40%, 5%, 80%), 96% EtOH as negative control, and Amoxicillin antibiotic as positif control. The method of this research used True Experimental. The research design used Posttest Only Control Group Design⁽¹⁴⁾. Unripe *Averrhoa bilimbi* L. fruit (green to yellowish green) with a size of 4-5.6 cm were collected from local area of Denpasar district-Bali, and authenticated by an expert botanist from Udayana University, Bali. Inhibitory activity was evaluated by measuring inhibition zone diameters. Data analysis began with the Kolmogorov Smirnov test, then One Way ANOVA test was used to determine the inhibition zone and LSD (Least Significant Deference) was used to determine the inhibitory zone variation between each concentration of *A. bilimbi* fruit EtOH extract. The time of the study began on June 1st to August 31st, 2018.

RESULTS

Inhibition zone of *Averrhoa bilimbi* L. fruit extract against *Streptococcus pyogenes* bacteria growth

In this study the inhibitory test of *A. bilimbi* fruit extracts concentrations of 20%, 40%, 60% and 80% was carried out on the growth of *Streptococcus pyogenes* bacteria using 96% EtOH as a negative control and Amoxicillin 25 µg as a positive control.

12

Table 1. Zone of inhibition of *A. bilimbi* fruit extract at various concentrations on the growth of *Streptococcus pyogenes* using the Kirby-Bauer's disc diffusion.

Extract/Control	<i>In vitro</i> assays		Mean of Inhibition Zone ± Standard Deviation (mm)	Category
	Inhibition Zone ± Standard Deviation			
	Replication I	Replication II		
20%	11.7 ± 0.46	11.15 ± 0.10	11.42 ± 0.26	Strong
40%	19.95 ± 0.06	18.30 ± 0.23	19.12 ± 0.14	Strong
60%	25.05 ± 0.06	24.10 ± 0.84	24.57 ± 0.42	Very strong
80%	29.10 ± 0.49	32.87 ± 0.25	30.99 ± 0.30	Very strong
Positive control	35.00 ± 0.0	36.40 ± 0.0	35.70 ± 0.0	Sensitive

Values represent mean ± standard deviation, n = 4.

The mean diameter of negative controls showed there was none inhibitory activity of *Streptococcus pyogenes* bacteria growth. The result of the largest inhibition zone was produced by 80% extract concentration which was equal to 30.99 mm, while the smallest diameter was obtained from 20% extract concentration which was 11.43 mm. The results of minimum inhibitory zone diameter and its inhibitory category are presented in Table 1. The inhibitory activity of *A. bilimbi* fruit extracts at concentration of 20% and 40% was categorized as strong inhibition because it has a diameter of inhibition zone 10-20 mm. While the inhibition of *A. bilimbi* fruit extracts at concentration of 60% and 80% was categorized as very strong with diameter of the inhibition zone >20 mm.

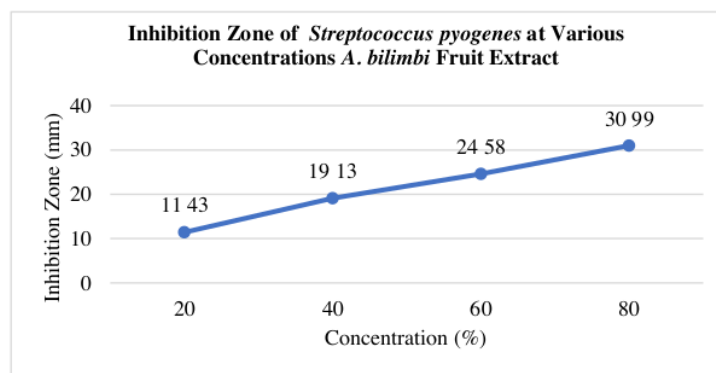


Figure 1. Inhibition Zone Differences of *Averrhoa bilimbi* L. fruit extract at various concentrations

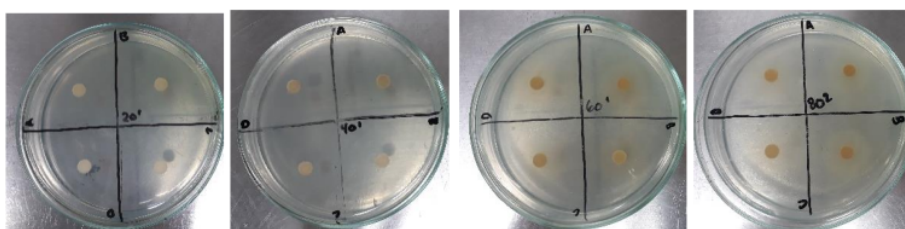


Figure 2. Diameter of inhibition zone at concentration of 20%, 40%, 60%, and 80% of *A. bilimbi* fruit extracts

Data analysis of differences inhibitory activity of *Averrhoa bilimbi* L. fruit extract

The Kolmogorov Smirnov test results obtained p-value was 0.476 (>0.05), than the p-value of One Way Anova test was 0.000 (<0.05). The results shown there was a differences inhibition zone of *Streptococcus pyogenes* bacteria growth at various concentrations of *A. bilimbi* fruit extract. The differences of inhibitory activity from various concentrations was analyzed by LSD test. The LSD test showed that p-value was 0.000 ($p < \alpha$), there were significant differences between each of the extracts concentration.

DISCUSSION

The inhibitory test was conducted to determine the antibacterial potential of *Averrhoa bilimbi* L. against *Streptococcus pyogenes* bacteria. *A. bilimbi* fruit extract was obtained through maceration method using 96% EtOH, the extract obtained then tested for its inhibitory activity at various concentrations with the Kirby-Bauer diffusion method. Based on the results of the observation, all the concentrations of the ethanol extract of *A. bilimbi* fruit have inhibition on the growth of *Streptococcus pyogenes* bacteria. Inhibition can be seen from the clear zones that formed around the disk containing *A. bilimbi* fruit extract. In this method, the extract on the disk will diffuse and the active substances contained in it will inhibit bacterial growth. The wider the clear zone formed shows the greater inhibitory activity. In this study, 96% ethanol was used as a negative control to determine whether there is an effect of ethanol on the growth of *Streptococcus pyogenes* bacteria which is also used as a solvent in the extraction process. The mean diameter of negative controls showed there is no inhibitory activity of *Streptococcus pyogenes* bacteria growth with a measured value of 0.00 mm. The same thing was also obtained from the study ethanol extract and decoction of *Myrmecodia sp.* on *Escherichia coli* Bacteria⁽¹⁵⁾.

In this study, the positive controls used Amoxicillin antibiotic discs as work controls. Amoxicillin is a broad-spectrum antibiotic that is widely used to treat human and animal diseases, which is included in the class of penicillin (β -lactam antibiotics). This antibiotic has been proven effective against various types of infections caused by gram-positive and gram-negative bacteria and used to treat and prevent respiratory, gastrointestinal, urinary and skin bacterial infections due to its pharmacological and pharmacokinetic properties⁽¹⁶⁾. The mean diameter of the inhibition zone from Amoxicillin antibiotic discs was 35.70 mm. These results are according to

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), where Amoxicillin belongs to the sensitive category. It is indicated the bacterial isolates used and the procedures carried out in this study are confirmed with testing standards for inhibiting antibacterial substances⁽¹⁷⁾. This study also shows that Amoxicillin is still effective against *Streptococcus pyogenes* bacteria, with a minimum inhibition zone diameter of > 24 mm⁽¹⁷⁾.

The results of this study shows that the fruit extracts of *A. bilimbi* at various concentrations were able to inhibit the growth of *Streptococcus pyogenes* which was characterized by the formation of clear zones around the discs. Inhibition activity is divided into four categories: inhibiting weak (<5 mm), medium (5-10 mm), strong (10-20 mm), and very strong (> 20 mm)⁽¹⁸⁾. The concentration of 20% (11.43 mm) and 40% (19.13 mm) have a strong inhibitory activity; 60% (24.58 mm) and 80% (30.99 mm) have very strong inhibitory activity. This study also shows that different diameter inhibition zones are formed for each concentrations. It might be caused *A. bilimbi* fruit contains various active compounds as antimicrobial properties such as flavonoids, alkaloids, tannins, and saponins; and antioxidant agent such as oxalic acid^(10,19). Oxalic acid also reported effective in reducing initial populations and controlling growth of spoilage bacteria on raw chicken breasts⁽²⁰⁾. The previously study also reported that the content of oxalic acid in *Averrhoa* species can become a potent source of antioxidant agent and antimicrobial against *S. aureus*⁽¹⁰⁾. The presence of the inhibition zone in this study indicates that extracts from unripe fruits contains of bioactive compounds that might be contribute to the antimicrobial properties of the fruits. The previously study reported the extracts from *A. bilimbi* unripe fruits are more effective against against *Salmonella spp*⁽²¹⁾. This is similar to the result of the present study where the microbiological stability of some fruits and vegetables can be attributed in part to the presence of oxalic acid. The antibacterial effect of oxalic acid is attributed to a reduction in the extracellular pH and cellular uptake of the undissociated form of oxalic acid. This uptake results in intracellular pH imbalance and subsequent death of the bacteria cell⁽²⁰⁾. Figure 1 shows that the higher the concentration, the inhibitory zone formed becomes wider. The similar result was reported in the study of the inhibitory activity of Binahong Leaf (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis extract against *Streptococcus pyogenes*⁽²²⁾. Factors that can influence the differences of inhibition zone are media thickness and concentration of active substance in the extract⁽²³⁾.

CONCLUSION

Based on the results of the research, it can be concluded that Unripe *A. bilimbi* fruit extract at various concentrations were able to inhibit the growth of *Streptococcus pyogenes*. The mean diameter of the largest inhibition zone was produced by 80% extract concentration with very strong inhibition category, while the smallest diameter was produced by 20% extract concentration with strong inhibition category. That might be caused *A. bilimbi* fruit contains various active compounds as antimicrobial properties and antioxidant agent, especially the presence of oxalic acid. There was a significant differences between the inhibition zones of the growth of *Streptococcus pyogenes* bacteria at the various concentrations of 20%, 40%, 60%, and 80%.

REFERENCES

1. Santosa R. Miraculous Concoction of Powerful Efficacy (Ramuan Ajaib Berkhasiat Dahsyat). Yogyakarta: Pinang Merah; 2014.
2. Ganders FR. The Biology of Heterostyly. N Z J Bot. 1979;17:607-635.
3. Goh S, Chuah C, Mok J, Soepadmo E. Malaysian Medicinal Plants for The Treatment of Cardiovascular Diseases. Malaysia: Pelanduk Publications; 1995:62-63.
4. Ong HC, Nordiana M. Malay Ethno-Medico Botany in Machang, Kelantan, Malaysia. Fitoterapia. 1999;70:502-513.
5. Alsarhan AN, Sultana N, Kadir MR, Aburjai T. Ethnopharmacological Survey of Medicinal Plants in Malaysia, The Kangkar Pulai Region. Int J Pharmacol. 2012; 8: 679-686.
6. Hasanuzzaman M, Ali MR, Hossain M, Kuri S, Islam MS. Evaluation of Total Phenolic Content, Free Radical Scavenging Activity and Phytochemical Screening of Different Extracts of *Averrhoa bilimbi* (Fruits). Int Curr Pharm J. 2013;2:92-96.
7. Patil AG, Koli SP, Patil DA. Pharmacognostical Standardization and HPTLC Fingerprint of *Averrhoa bilimbi* (L.) Fruits. J Pharm Res. 2013;6:145-150.
8. Siddique KI, Uddin MMN, Islam MS, Parvin S, Shahriar M. Phytochemical Screenings, Thrombolytic Activity and Antimicrobial Properties of The Bark Extracts of *Averrhoa bilimbi*. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2013;3(03):094-096.
9. Akbar R. Various Pharmacy Plants Live Around Us Ed I (Aneka Tanaman Apotek Hidup di Sekitar Kita Edisi I). Edited by Cahyono. 2015.
10. Sripanidkulchai B, Tattawasart U, Laupattarakasem P, Wongpanich V. Anti Imflammatory and Bactericidal Properties of Selected Indigenous Medicinal Plants Used for Dysuria. HDI J Pharm Sci. 2002;26:33-38.

11. Zakaria ZA, Zaiton H, Henie EF, Jais AM, Zainuddin EN. In Vitro Antibacterial Activity of *Averrhoa bilimbi* L. Leaves and Fruits Extracts. Int J Trop Med. 2007;2:96-100.
12. Mohamad S, Zin NM, Wahab HA, Ibrahim P, Sulaiman SF, Zahariluddin AS. Antituberculosis Potential of Some Ethnobotanically Selected Malaysian Plants. J Ethnopharmacol. 2011;133:1021-1026.
13. Rahmiati A. Inhibitory Potensial of Wuluh Starfruit Extract (*Averrhoa bilimbi* L) Against Streptococcus Mutans Bacteria Growth *In Vitro* (Daya hambat Ekstrak Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Streptococcus mutans Secara *In Vitro*). Jurnal Penelitian dan Kajian Ilmiah Kesehatan, 2016;2(2):55–62.
14. Sugiyono. Qualitative Quantitative Research Methods and R & D (Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D). Bandung: ALFABETA; 2012.
15. Roslizawaty, Ramadani NY, Fakhurrizi, Herrialfian. Antibacterial Activity of Ethanol Extract and Ants Nest Decoction (*Myrmecodia* sp.) Against *Escherichia coli* Bacteria (Aktivitas Antibakterial Ekstrak Etanol dan Rebusan Sarang Semut (*Myrmecodia* sp .) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*). Jurnal Medika Veterinaria. 2013;7(2):91–94.
16. Elizalde A, Velázquez, Gómez O, Galar M, Flores I. World's Largest Science, Technology & Medicine: Amoxicillin in The Aquatic Environment, Its Fate and Environmental Risk. Wasington DC: Intech; 2016:248-267.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing. 27th edn. Edited by L. Megan and M. Tertel. West Valley Road USA: 2017.
18. Davis WW, Stout TR. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. Applied and Enviromental Microbiology. 2009;22(4):666-670.
19. Gendrowati F. Family Medicinal Plants (TOGA Tanaman Obat Keluarga). Edited by Geulis. Jakarta Timur: Padi; 2015.
20. Anang DM, Rusul G, Radu S, Bakar J, Beuchat LR. Inhibitory Effect of Oxalic Acid on Bacterial Spoilage of Raw Chilled Chicken. Journal of Food Protection, 2006;69(8):1913–1919.
21. Mokhtar SI, Nur AAA. Antimicrobial Properties of *Averrhoa bilimbi* Extracts at Different Maturity Stages Seri. J Medical Microbiology & Diagnosis. 2016;5(3).
22. Virgianti DP, Purwati DM. Inhibitory Activity of Ethanol Extract of Binahong Leaf (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Against *Streptococcus pyogenes* Bacteria in In Vitro (Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus pyogenes* Secara In Vitro. Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada; 2015;13(1);24–27.
23. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Medical Microbiology (Mikrobiologi Kedokteran). 25th Ed. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2012.

In vitro Inhibitory Activity of Ethanolic Fruit Extract from Averrhoa bilimbi L. against Streptococcus pyogenes Bacteria

ORIGINALITY REPORT

7%

SIMILARITY INDEX

3%

INTERNET SOURCES

5%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

- | | | |
|---|---|---|
| <div style="background-color: red; color: white; width: 40px; height: 40px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 5px;">1</div> | <p>Anees Muhammad, Sadiq Noor Khan, Nasir Ali, Mujeeb Ur Rehman, Ihsan Ali. "Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of uropathogens in outpatients at a tertiary care hospital", New Microbes and New Infections, 2020</p> <p>Publication</p> | <div style="font-size: 2em; font-weight: bold;">1</div> % |
| <hr/> | | |
| <div style="background-color: purple; color: white; width: 40px; height: 40px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 5px;">2</div> | <p>repository.unej.ac.id</p> <p>Internet Source</p> | <div style="font-size: 2em; font-weight: bold;"><1</div> % |
| <hr/> | | |
| <div style="background-color: purple; color: white; width: 40px; height: 40px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 5px;">3</div> | <p>Dinesh Kumar, Upendra Sharma. "High-performance thin-layer chromatography: An economical alternative for the quality control of medicinal plants and derived products", Separation Science Plus, 2018</p> <p>Publication</p> | <div style="font-size: 2em; font-weight: bold;"><1</div> % |
| <hr/> | | |
| <div style="background-color: teal; color: white; width: 40px; height: 40px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 5px;">4</div> | <p>id.123dok.com</p> <p>Internet Source</p> | <div style="font-size: 2em; font-weight: bold;"><1</div> % |
| <hr/> | | |
| <div style="background-color: green; color: white; width: 40px; height: 40px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 5px;">5</div> | <p>pt.scribd.com</p> <p>Internet Source</p> | <div style="font-size: 2em; font-weight: bold;"><1</div> % |

6

Muhammad Harun Achmad, Sri Ramadhany, Yunita Feby Ramadhany. " RESISTIVITY OF PROTEIN KINASE-B (AKT), NF-κB TRANSDUCTION OBSTACLES, AND APOPTOSIS INDUCTION (CASPACE -3, -9) AS ANTI-PROLIFERATION AND ANTI-CANCER OF BURKITT'S LYMPHOMA USING FLAVONOID FRACTION OF ETHYL ACETATE FROM ANT NEST () ", Journal of Physics: Conference Series, 2019

Publication

<1 %

7

Z. A. Zakaria, E. S. Jaio, M. H. Omar, S. Abd. Rahman, S. S. A. Hamid, S. M. Ching, L. K. Teh, M. Z. Salleh, S. Deny, M. Taher. "Antinociception of petroleum ether fraction derived from crude methanol extract of Melastoma malabathricum leaves and its possible mechanisms of action in animal models", BMC Complementary and Alternative Medicine, 2016

Publication

<1 %

8

ijpacr.com
Internet Source

<1 %

9

www.esd-conference.com
Internet Source

<1 %

10

Roumita Seebaluck-Sandoram, Namrita Lall, Bianca Fibrich, Analike Blom van Staden,

<1 %

Hammad Saleem, Mohamad Fawzi Mahomoodally. "Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic evaluation of two underutilised food plants: Averrhoa bilimbi L. (Oxalidaceae) and Phyllanthus acidus L. Skeels (Phyllanthaceae)", Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019

Publication

11

docplayer.info

Internet Source

<1 %

12

link.springer.com

Internet Source

<1 %

13

Abas, F.. "Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of selected Malay traditional vegetables", Food Chemistry, 200604

Publication

<1 %

14

Thainara Marcotto Alba, Carla Maria Garlet de Pelegrin, Andréa Michel Sobottka.

"Ethnobotany, ecology, pharmacology, and chemistry of Anredera cordifolia (Basellaceae): a review", Rodriguésia, 2020

Publication

<1 %

15

journal.uin-alauddin.ac.id

Internet Source

<1 %

16

Çağatay Dereceli. "An Examination of Concentration and Mental Toughness in

<1 %

Professional Basketball Players", Journal of Education and Training Studies, 2018

Publication

Exclude quotes On

Exclude matches Off

Exclude bibliography On

IDENTIFIKASI GEN PENYANDI PROTEIN TRANSPORT SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN SUBUNIT TERHADAP BAKTERI ESCHERICHIA COLI PENYEBAB DIARE WISATAWAN

by B 3

Submission date: 15-May-2021 06:28AM (UTC+0700)

Submission ID: 1586355438

File name: Jurnal_Sains_dan_Teknologi_2020.pdf (266.33K)

Word count: 4964

Character count: 29675

IDENTIFIKASI GEN PENYANDI PROTEIN TRANSPORT SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN SUBUNIT TERHADAP BAKTERI *ESCHERICHIA COLI* PENYEBAB DIARE WISATAWAN

Burhannuddin Rasyid¹, I Wayan Karta¹, Ni Luh Putu Eka Kartika Sari²,
I Gusti Ngurah Dwija Putra²

¹Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Denpasar
Denpasar, Indonesia

²Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Warmadewa
Denpasar, Indonesia

e-mail: boerhannuddin@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi gen penyandi protein transport sebagai kandidat vaksin subunit terhadap *E. coli* penyebab diare wisatawan. Pengambilan sampel feses dilakukan di Ubud Care Clinic pada wisatawan yang melakukan pemeriksaan diare. Sampel dikultur pada media *Eosin Metilen Blue*, koloni tersangka kemudian diuji biokimia untuk mengkonfirmasi jenis bakteri yang ditemukan. Isolat positif *E.coli* selanjutnya disubkultur pada media *Nutrient Broth*, kemudian DNA *E.coli* diisolasi dengan GeneJET Genomic DNA Purification Kit. DNA hasil isolasi selanjutnya digunakan sebagai *template* reaksi PCR menggunakan pasangan primer yang mengenali gen *aidA* penyandi protein transport pada *E.coli*. Berdasarkan hasil kultur pada media EMB dan hasil uji biokimia pada media TSIA, SIM, Simon Citrat dan uji gula-gula didapatkan sebanyak 20 (59 %) dari 34 sampel feses penderita diare wisatawan positif bakteri *E. coli*. DNA dari 20 isolat *E.coli* berhasil diisolasi dengan ukuran sekitar 12000-13000 bp. Hasil PCR dari 20 sampel DNA bakteri *E. coli* terdapat 5 sampel positif mengandung gen *aidA* yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA tunggal dengan ukuran sekitar 585 bp. Keberadaan gen *aidA* yang menyandi protein transport menunjukkan sifat patogenitas, yang membedakan antara *E.coli* pathogen dengan *E.coli* non-pathogen

Kata kunci: Diare Wisatawan, *E.coli*, Gen Protein Transport

Abstract

This study aims to isolate and determine the characteristics of the transport protein-coding gene for *E.coli* bacteria that cause traveler's diarrhea. Stool sampling was performed at the Ubud Care Clinic for tourists who checked diarrhea. Samples were cultured on Eosin Methylene Blue media. Suspect colonies on EMB media were tested biochemically to confirm the type of bacteria found. *E.coli* positive isolates were then subcultured on Nutrient Broth media, then bacterial DNA was isolated with the GeneJET Genomic DNA Purification Kit. The isolated DNA was then used as a PCR reaction template using a pair of primers that recognized the *aidA* gene of *E. coli*. Based on the culture results on the media Eosin Methylene Blue (EMB) and the results of biochemical tests on TSIA, SIM, Simon Citrate media and sugar tests were obtained as many as 20 (59%) from 34 stool samples of diarrhea patients positive *E. coli* bacteria

Keywords: Traveler's diarrhea, *E. coli*, Protein Transport Gene

PENDAHULUAN

Diare wisatawan terus menjadi masalah kesehatan yang paling sering dialami oleh wisatawan yang mengunjungi negara-negara berkembang terutama negara dengan kondisi sanitasi yang buruk (Olson et al., 2019; Steffen, 2017). Diare wisatawan ditandai dengan kondisi tinja yang tidak berbentuk sebanyak tiga kali atau lebih per hari, yang disertai dengan satu atau lebih gejala enterik seperti sakit perut atau kram. Gejala tersebut dialami oleh seseorang setelah kedatangan pada suatu wilayah dengan tujuan perjalanan wisata (Connor, 2019). Diare wisatawan me-nyebabkan morbiditas yang signifikan seperti adanya gejala sisa, hilangnya waktu per-jalanan, dan berkurangnya pendapatan bagi pelaku wisata pada negara yang dikun-jungi (Riddle et al., 2017).

Prevalensi diare wisatawan dilaporkan berkisar dari 30% hingga 70%, tergantung pada tujuan dan musim perjalanan yang dilakukan. Sekitar 25% wisatawan mengem-bangkan diare dalam 2 minggu pertama di luar negeri, dengan tingkat tertinggi terjadi ketika melakukan perjalanan ke Afrika dan Asia Selatan, Tengah dan Barat (Pitzurra et al., 2010). Diare wisatawan dapat terjadi segera setelah kembali dan dapat dibedakan menjadi dua kategori, yaitu akut dan persisten. Tipe akut sebagian besar disebabkan oleh bakteri dan virus patogen, biasanya ringan dan dapat sembuh tanpa pengobatan. Sedangkan tipe persisten umumnya oleh infeksi parasit seperti *Giardia* dan *Entamoeba* (Saussure, 2009). Praktik kebersihan yang buruk di restoran lokal kemungkinan merupakan kontributor terbesar terhadap risiko terjadinya diare wisatawan (Connor, 2019).

Tingkat kejadian diare wisatawan khususnya di Indonesia belum banyak dipub-likasikan. Hasil survey suatu studi melaporkan angka kejadian diare pada wisatawan yang mengunjungi rumah sakit di Bali adalah 5% dari 2429 kasus diare. Masih ada kemungkinan insiden diare wisatawan meningkat jika survei dilakukan di semua klinik di Bali. Tingginya angka diare wisatawan dapat mempengaruhi jumlah kunjungan wisatawan internasional

dan secara tidak langsung mempengaruhi perekonomian masyarakat setempat, terutama yang menggunakan bidang pariwisata sebagai salah satu sumber pendapatan (Ani, Suwiyoga, 2016).

Terdapat berbagai faktor yang memengaruhi kejadian diare wisatawan antara lain faktor lingkungan, *host*, dan agen penyebab. Kondisi lingkungan utama hotel dan restoran, khususnya di Bali sebagai daerah tujuan utama wisata di Indonesia dilaporkan bersih tetapi untuk beberapa tempat masih belum memenuhi syarat kesehatan. Wisatawan juga cenderung mengonsumsi makanan daerah yang tidak higienis sehingga beresiko mendapatkan infeksi bakteri. Faktor *host* juga memengaruhi kejadian diare wisatawan seperti usia, kebiasaan makan dan minum, sosial ekonomi, negara asal, daerah yang dikunjungi, riwayat profilaksis atau persiapan lain sebelum kunjungan (Ani, Suwiyoga, 2016).

Agen penyebab diare wisatawan terutama adalah bakteri, virus, dan parasit (Steffen et al., 2015). Bakteri menjadi penyebab utama diare wisatawan dengan angka kejadian mencapai 80%, sedangkan virus menyebabkan kira-kira 5% hingga 10% kasus. Statistik ini bervariasi sesuai dengan lokasi geografis, dapat naik mencapai 60% kasus jika terjadi infeksi campuran (Steffen, 2018).

Bakteri *E.coli* merupakan penyebab utama diare endemik dan epidemik di dunia. Secara genetik, bakteri *E. coli* bervariasi dan dapat menginfeksi jutaan orang tiap tahunnya (Tang & Saier, 2014). *E. coli* dilaporkan sebagai enteropathogen yang paling banyak diisolasi dari sampel feses penderita diare wisatawan (54,1%) di Denpasar, lebih tinggi dibandingkan jenis bakteri enterik lainnya seperti *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Shigella* sp. Berdasarkan type diare yang dialami wisatawan, diduga diare wisatawan tersebut disebabkan oleh *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC) dan *Enteraggregative E. coli* (EAEC). Kedua strain *E.coli* tersebut diketahui memiliki onset cepat mulai dari 8-48 jam (Masyeni et al., 2017).

ETEC) dan EAEC merupakan penyebab utama diare wisatawan yang

secara signifikan berkontribusi juga pada mortalitas bayi (Tang & Saier, 2014). Bakteri ini dapat mengkontaminasi makanan dan menyebabkan diare pada wisatawan. Hasil penelitian lain menunjukkan dari 40% sampel positif *E.coli* pada penjamah makanan, sebanyak 31,4% merupakan sub tipe EAEC; 5,7% sub tipe ETEC; dan 3% memiliki kedua gen yaitu ETEC dan EAEC. Pen-jamah makanan dapat bertindak sebagai carrier berbagai penyakit infeksi seperti diare (Gitaswari & Budayanti, 2019). Selain dua strain tersebut, tipe *E.coli Enteropathogenic* (EPEC), *Enterohaemorrhagic* (EHEC), *Enteroinvasive* (EIEC), dan *Diffusely Adherent* (DAEC) juga dapat menyebabkan diare (Tang & Saier, 2014).

Patogenesis dari berbagai strain *E.coli* dipengaruhi oleh faktor virulensi seperti adhesi, injeksi protein pada sel host, mekanisme signaling, dan kolonisasi yang mengganggu respon imun, kerusakan membran sel dan manipulasi sitoskeleton. Selama tahap injeksi, *E.coli* mensekresikan molekul efektor pada sel host yang menggunakan satu atau lebih system sekresi protein dengan tujuan menghindari system imun atau mengubah jalur signal sel (Tang & Saier, 2014).

Pemberian vaksin merupakan salah satu cara untuk mencegah diare yang diakibatkan infeksi bakteri *E.coli*, namun vaksin protektif yang luas terhadap *E. coli* patogen saat ini belum tersedia. *E. coli* diketahui memiliki sifat yang kompleks dan terus berkembang dari isolat non-virulen menjadi strain yang sangat patogen (Nesta & Pizza, 2018). Adanya peningkatan patogenitas, virulensi, dan resistensi terhadap multi-obat meningkatkan perhatian terhadap perawatan kesehatan dan membutuhkan upaya terus menerus dalam pengawasan epidemiologis dan pemantauan penyakit.

Pengetahuan yang berkembang tentang mekanisme patogenesis *E. coli* dan respon imun yang dimediasi setelah infeksi atau vaksinasi, bersama dengan kemajuan dalam teknologi "omics", membuka perspektif baru terhadap desain dan pengembangan vaksin *E. coli* yang efektif dan inovatif. Pengembangan vaksin alternatif terhadap *E. coli* penyebab diare

perlu terus diupayakan dengan memperhatikan pathogenesis infeksi sehingga bisa menghasilkan proteksi yang lebih baik dengan efek samping yang kecil.

Sejumlah protein transport telah diketahui berperan dalam patogenesis diare sehingga pemahaman tentang ekspresi, lokasi, dan regulasi protein setelah infeksi penting untuk mendesain terapi (Das et al., 2018). Salah satu jenis protein transport yang berperan dalam patogenesis *E. coli* adalah protein adhesin. Protein ini berperan memediasi penempelan bakteri *E. coli* pada sel host dan merupakan salah satu mekanisme penting dalam proses infeksi. Protein adhesin merupakan faktor virulensi yang signifikan berperan dalam kolonisasi bakteri pada usus dan pembentukan biofilm. Protein adhesin dikode oleh gen *aidA* yang terdapat pada genom bakteri *E.coli* patogen. Gen *aidA* pertama kali diidentifikasi dan dikarakterisasi dari bakteri *E.coli* penyebab diare pada neonatal (Ravi, 2006).

Identifikasi gen *aidA* dapat dilakukan dari strain bakteri *E. coli* penyebab diare dari berbagai serotype. Gen kemudian dapat diisolasi dan dikloning menggunakan plasmid untuk dapat diekspresikan menjadi protein adhesin. Saat ini, berbagai macam protein yang dihasilkan oleh bakteri dapat dijadikan protein rekombinan dan dikembangkan sebagai kandidat vaksin sub unit. Pada penelitian ini, gen *aidA* yang merupakan penyandi protein adhesin diidentifikasi dan diisolasi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Penelitian ini merupakan tahap awal untuk pengembangan protein adhesin sebagai vaksin subunit terhadap *E.coli* khususnya penyebab diare wisatawan. Penelitian tentang penggunaan protein adhesin sebagai kandidat vaksin *E. coli* khususnya di Indonesia belum banyak dilakukan. Penelitian ini diharapkan membuka peluang penemuan vaksin alternatif terhadap infeksi *E.coli* pathogen yang berbasis protein rekombinan.

22 METODE

Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif dengan mengidentifikasi bakteri *E.coli* penyebab diare wisatawan menggunakan metode konvensional dan molekuler berdasarkan keberadaan gen *aidA* pengkode protein transport.

31

Waktu dan tempat

Penelitian dilakukan dari bulan September 2019 - November 2019. Pengambilan sampel feses dilakukan di *Ubud Care Clinic*, Ubud, Gianyar pada wisatawan yang melakukan pemeriksaan diare. Identifikasi bakteri *E.coli* dari sampel feses dilakukan di *Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar*. Isolasi DNA dan identifikasi gen *aidA* dengan teknik PCR dilakukan di *Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Warmadewa*.

Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel feses yang diperoleh dari 34 wisatawan yang melakukan pemeriksaan diare di *Ubud Care Clinic*, Gianyar.

18

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *biosafety cabinet* (Biobase), inkubator (T01892-Esco), mesin PCR (Biometra), alat elektroforesis (Biometra), alat pembacaan UV Solo (Sientra BD), *magnetic dan stirrer* (Jisico), *autoclave* (SX-500, TOMY), *oven* (wagtech), *micropipet* 50-500 μ l (Socorec), neraca analitik (Radwag), vortex, dan *water bath*.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu media NB (Oxoid), tabung eppendorf, pasangan primer spesifik *Aida1- F* ACAGTATCATATGGAGCCA dan *Aida1- R* TGTGCGCCAGAACTATTA, *buffer* TAE, proteinase K, RNase A *solution*, etanol 50%, bubuk agarosa, *GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific)*, loading dye, PCR Mix, dan ddH₂O.

Prosedur Kerja

Sampel feses dikoleksi dari 34 wisatawan yang melakukan pemeriksaan diare di *Ubud Care Clinic*, Gianyar. Sampel dikultur pada media selektif *Metilen Blue* (EMB) yang diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Koloni tersangka *E.coli* pada media EMB dikonfirmasi dengan uji biokimia pada media TSIA, SIM, simon citrat, dan gula-gula dengan *E.coli* ATCC 25922 sebagai standar kuman. Koloni yang teridentifikasi *E.coli* dikultur pada media *Nutrien Broth* pada suhu inkubasi 37°C selama 24 jam. DNA *E.coli* diisolasi dari hasil kultur pada media *Nutrien Broth* dengan *GeneJET Genomic DNA Purification Kit*.

32

DNA *E.coli* hasil isolasi digunakan sebagai template untuk reaksi PCR dengan menggunakan pasangan primer gen *Aida*, yaitu *Forward-ACAGTATCATATGGAGCCA* dan *Reverse-TGTGCGCCAGAACTATTA*. Reaksi PCR dilakukan dengan mencampurkan 25 μ l PCR Mix, 2 μ l primer *Forward*, 2 μ l primer *Reverse*, 5 μ l DNA Template, dan 16 μ l *nuclease free water*. Campuran reaksi kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR *thermo cycler* dengan suhu *Pre-denaturasi* (94°C, 15 menit), *Denaturasi* (94 °C, 45 s), *Annealing* (57 °C, 30), *Ekstensi* (72 °C, 45 s), *PCR* ekstensi (72 °C, 10 menit) dengan 35 Siklus. Hasil PCR dielektroforesis menggunakan gel agarose 1.5 % selama 45 menit, kemudian pita DNA dibaca menggunakan UV gel documentation.

Metode Pengumpulan Data

Data dikumpulkan melalui pemeriksaan laboratorium terhadap sampel, hasil isolasi bakteri *E.coli* dengan metode kultur, isolasi DNA total dengan *GeneJet Genomic DNA Purification Kit*, dan isolasi gen *aidA* dengan teknik PCR.

13

Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis deskriptif, dengan menggambarkan dan mengkarakterisasi gen pengkode protein transport yang diisolasi dari bakteri *E.coli* penyebab diare wisatawan.

HASIL DAN PEMBAHASAN**HASIL PENELITIAN****Isolasi Bakteri *E.coli* dari Penderita Diare Wisatawan**

Berdasarkan hasil kultur pada media Eosin Metilen Blue (EMB) dan hasil uji

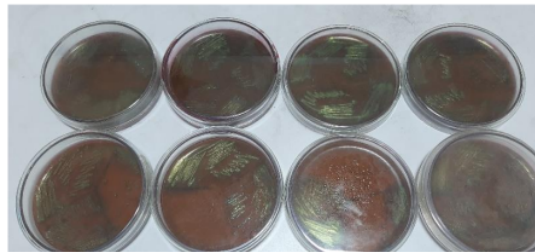
biokimia pada media TSIA, SIM, Simon Citrat dan uji gula-gula didapatkan sebanyak 20 (59 %) dari 34 sampel feses penderita diare wisatawan positif bakteri *E.coli* (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Bakteri *E.coli* dari sampel feses penderita diare

No	Hasil Pemeriksaan	Jumlah Sampel	%
1	Positif <i>Escherichia coli</i>	20	59
2	Negatif <i>Escherichia coli</i>	14	41
TOTAL		34	100

Bakteri *E.coli* pada media Eosin Metilen Blue memiliki ciri khas yaitu berwarna hijau Metalik dengan permukaan rata dan terdapat bintik hitam

di tengah koloni. Hasil subkultur bakteri *E.coli* pada media EMB ditunjukkan pada gambar di bawah ini (Gambar 1).

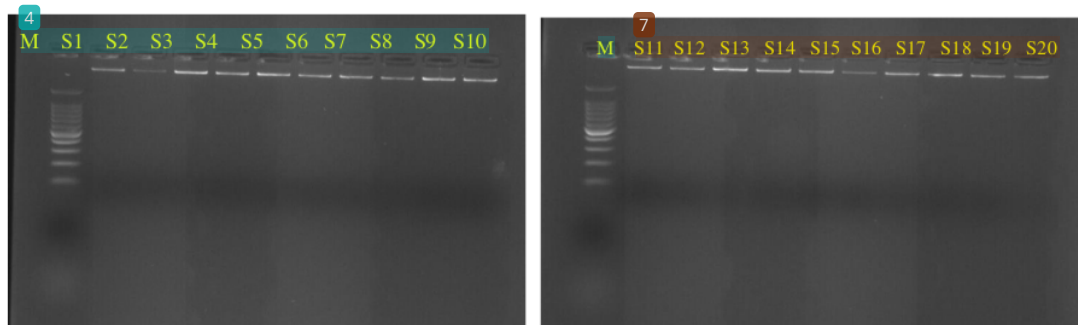


Gambar 1. Hasil isolasi Bakteri *E.coli* pada media EMB

Hasil Isolasi DNA Bakteri *Escherichia coli*

Isolat bakteri *E.coli* yang didapatkan sesuai hasil pemeriksaan di atas selanjutnya digunakan sebagai sumber untuk mengisolasi DNA bakteri *E.coli*. Masing-masing isolat diremajakan pada media *Nutrient Broth* selama 24 jam

kemudian DNA bakteri diisolasi dengan *GeneJET Genomic DNA Purification Kit*. DNA dari 20 sampel *E.coli* penyebab diare wisatawan berhasil diisolasi dengan ukuran pita DNA sekitar 12.000-13.000 bp. Hasil isolasi DNA ditunjukkan pada Gambar 2 di bawah ini :

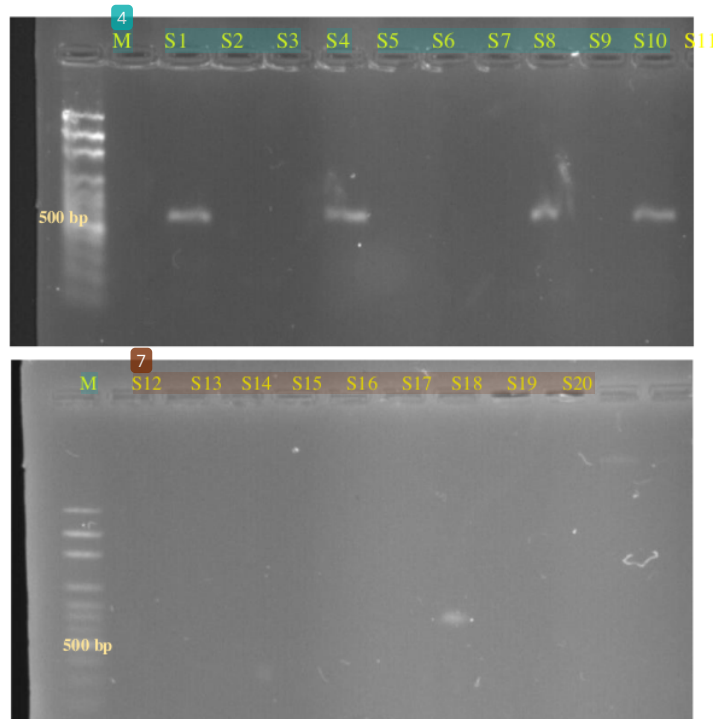


Gambar 2 Hasil isolasi DNA dari isolat bakteri *Escherichia coli*
Ket : M (Marker 100 bp), S1-S20 (Sampel 1-20)

Hasil Amplifikasi Gen Pengkode Protein Transport *E.coli* dengan Teknik PCR

Reaksi PCR dalam penelitian ini menggunakan pasangan primer *Forward*-ACAGTATCATATGGAGCCA dan *Revers*-TGTGCGCCAGAACTATTA yang spesifik mengenali gen *aidA* pengkode protein adhesin pada bakteri *E.coli*. Hasil PCR

menunjukkan 5 dari 20 sampel DNA *E.coli* penyebab diare wisatawan memiliki gen *aidA* pengkode protein adhesin dengan ukuran pita DNA sekitar 585 bp. Hasil PCR dari masing-masing sampel DNA *E. coli* penyebab diare wisatawan ditunjukkan pada Gambar 3 di bawah ini :



Gambar 3. Hasil PCR gen *aidA* pada bakteri *E. coli* penyebab diare wisatawan
Ket : M (Marker 100 bp), S1-S20 (Sampel 1-20)

PEMBAHASAN

E. coli penyebab diare wisatawan pada penelitian ini diisolasi pada media EMB. Media EMB merupakan media selektif dan diferensial untuk menumbuhkan bakteri *E. coli*. Pada media ini, bakteri *E. coli* memfermentasi laktosa dan memproduksi asam. Suasana asam pada media menyebabkan indikator warna asam bekerja dan mengubah warna media menjadi kehijauan (Gambar 1).
23 IB secara selektif menumbuhkan bakteri enterik gram negatif dan

menghambat pertumbuhan bakteri gram positif termasuk pertumbuhan yeast. Media ini mengandung zat pewarna metilen blue yang bersifat toksik pada mikroorganisme tersebut kecuali pada kelompok bakteri enterik. Bakteri *E. coli* pada media ini menunjukkan warna koloni yang khas yaitu hijau metalik (Antony et al., 2016). Ciri ini membedakan *E. coli* dengan bakteri enterik lain yang tumbuh pada media EMB.

Koloni yang berwarna hijau metalik kemudian diuji biokimia untuk mengkonfirmasi hasil pemeriksaan yang didapatkan. Berdasarkan hasil uji biokimia yang telah dilakukan, koloni-koloni tersebut menunjukkan hasil yaitu memfermentasi ketiga gula pada media TSIA, motilitas positif, indol positif, uji pada media gula-gula (glukosa, laktosa, sukrosa, manitol, maltosa) positif, dan negatif pada uji sitrat. Hasil uji biokimia ini sesuai dengan karakteristik biokimiawi bakteri *E. coli* (Lupindu, 2017; Hidayati *et al.* 2016)

Bakteri *E. coli* merupakan jenis bakteri yang menjadi penyebab umum kejadian diare. Penelitian oleh Masyeni *et al.* (2017) mendapatkan sebanyak 54,1 % kasus diare wisatawan di Denpasar disebabkan oleh *E. coli*. Hasil yang tidak jauh berbeda didapatkan pada penelitian ini, yaitu sebanyak 59 % kejadian diare wisatawan di wilayah Ubud disebabkan oleh *E. coli*. Penelitian lain oleh Ericsson *et al.* (2007) menunjukkan *E. coli* merupakan enteropatogen yang paling sering diidentifikasi dalam kultur tinja sebelum pengobatan pada kasus diare wisatawan. *Enterotoxigenic E. coli* diidentifikasi pada 109 (36%) dari 306 sampel yang diuji, dan *enteroaggregative E. coli* , terdeteksi dalam 50 (16%) dari 306 sampel. Vila *et al.*, (2001) sebelumnya telah melaporkan isolat *Enteraggregative E. coli* sebagai penyebab diare perjalanan pada 50 (9%) dari 517 pasien dan menunjukkan adanya peningkatan resistensi terhadap quinolone.

Bakteri *E. coli* penyebab diare wisatawan dalam penelitian ini merupakan jenis *E. coli* patogen yang dapat dibedakan dengan *E. coli* tipe komensal berdasarkan faktor virulensi yang dimiliki. Jenis *E. coli* patogen memiliki daya tahan dan berbagai faktor virulensi yang meningkatkan patogenitasnya sehingga dapat menimbulkan diare pada wisatawan. Menurut Gebisa *et al.* (2019) beberapa strain *E. coli* patogen menyebabkan penyakit diare dan dikategorikan ke dalam kelompok spesifik berdasarkan sifat virulensi, mekanisme patogenisitas, sindrom klinis, dan serogrup O:H yang berbeda. Beberapa faktor virulensi paling penting dari *E. coli* antara lain yaitu resistensi

terhadap asam; keberadaan berbagai tipe protein adhesi seperti fimbriae, fibrillae, curli dan protein membran luar; penggunaan sistem sekresi tipe III untuk mengubah jalur pensinyalan sel dengan menyuntikkan protein yang virulen ke dalam sitoplasma sel inang seperti protein *alkaline phosphatase* yang dikodekan oleh gen *Pho* dan berbagai jenis toksin yang meningkatkan virulensi *E. coli* di dalam sel inang.

Selain faktor adanya virulensi *E. coli* yang meningkatkan kerentanan wisatawan terhadap diare, berbagai faktor lain dapat menyebabkan terjadinya diare wisatawan. Bakteri *E. coli* merupakan indikator sanitasi lingkungan yang dapat mengkontaminasi air, makanan, atau minuman. Wisatawan dapat mengalami intoleransi makanan atau malabsorpsi karena kebersihan makanan atau minuman yang tidak memadai (Wahyuni *et al.*, 2019). Faktor risiko lain yang menjadi penyebab diare perjalanan pada wisatawan asing di Bali meliputi usia wisatawan, lama tinggal, dan perilaku mencuci tangan (Ani, Suwiyoga, 2016). Diare wisatawan biasanya terjadi di daerah dengan keadaan sanitasi dan higienitas masih kurang (Steffen, 2017). Wahyuni *et al.* (2019) dalam penelitiannya melaporkan konsumsi makanan jalanan dan makanan tradisional hasil olahan daging babi ditemukan terkait dengan kejadian diare pada wisatawan asing saat berkunjung ke Bali. Menurut Bauch and DuPon (2011) faktor genetik juga dapat memengaruhi kerentanan wisatawan terhadap diare. Individu dapat mengalami variasi kerentanan karena predisposisi genetik yang muncul akibat adanya polimorfisme nukleotida tunggal. Variasi ini mengakibatkan perbedaan dalam regulasi ekspresi protein penanda inflamasi yang terkait diare .

DNA *E. coli* diisolasi sebagai template untuk reaksi PCR gen *aidA* pengkode protein transport *E. coli* . DNA bakteri *E. coli* berhasil diisolasi yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA tunggal pada hasil pembacaan elektroforesis gel agarosa pada Uvdoc (Gambar 2). Elektroforesis gel agarosa berperan sebagai sirkuit elektrik untuk memisahkan fragmen-fragmen DNA berdasarkan

jumlah nukleotida penyusunnya. Semakin kecil ukuran pasang basa nukleotidanya, akan semakin mudah bermigrasi dan berada di bagian gel yang dekat dengan anoda (Radji *et al.*, 2010). DNA pada gel agarosa akan berpendar saat disinari dengan cahaya UV karena pada gel terdapat staining gel. Senyawa ini akan berinterkalasi diantara struktur molekul asam nukleat dan menyebabkan timbulnya pendaran berupa pita DNA saat disinari UV. Setelah dibandingkan dengan marker, band yang muncul memiliki genom DNA berukuran lebih dari 10.000 bp yakni berkisar antara 12.000-13.000bp.

Isolasi DNA dengan prosedur menggunakan GenJet Genomic DNA Purification Kit dalam penelitian ini menunjukkan kualitas hasil yang cukup baik. Prosedur ekstraksi yang dikerjakan relatif lebih sederhana dan cepat dibandingkan prosedur ekstraksi standar. Pita DNA yang didapatkan berupa pita tunggal, tampak tebal dan jelas, serta tidak tampak smear yang menandakan rendahnya kontaminasi baik oleh RNA maupun protein. Kemurnian DNA yang akan digunakan sebagai *template* sangat penting untuk meningkatkan efisiensi saat reaksi PCR. Ammazalorso *et al.* (2015) dengan kit ekstraksi DNA yang sama mendapatkan kualitas DNA paling tinggi dan hasil PCR yang konsisten dibandingkan ekstraksi DNA menggunakan prosedur standar. Ravintheran *et al.* (2019) menggunakan prosedur ekstraksi yang sama untuk mengisolasi genom bakteri *Sphingomonas paucimobilis* untuk tujuan sekuensing. Sedangkan Juhas and Ajioka (2016) menggunakan prosedur ini untuk mendapatkan genom *Bacillus subtilis* untuk tujuan rekayasa genetika.

Reaksi PCR dalam penelitian ini menggunakan pasangan primer *Forward*-ACAGTATCATATGGAGCCA dan *Reverse*-TGTGCGCCAGAACTATTA yang spesifik mengenali gen *aidA* pengkode protein adhesin pada bakteri *E.coli*. Hasil PCR menunjukkan 5 dari 20 sampel *E.coli* penyebab diare wisatawan memiliki gen *aidA* pengkode protein adhesin dengan ukuran pita DNA sekitar 585 bp (Gambar 3).

Keberadaan gen *aidA* pengkode protein transport pada sampel tersebut menunjukkan sifat patogenitas, yang membedakan antara *E.coli* patogen dengan *E.coli* non-patogen. Pada *E.coli* patogen memiliki system sekresi yang akan melepaskan protein ke permukaan sel atau menginjeksikan suatu protein efektor ke dalam sel inang (Tang & Saier, 2014). Beberapa strain *E.coli* 34h dikarakterisasi sebagai agen etiologi diare baik pada anak-anak 10 maupun orang dewasa, antara lain Enteropathogenic *E.coli* (EPEC), Verocytotoxinigenic *E.coli* (VTEC), Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC), Enteraggative *E.coli* (EAEC), Enteroinvasive *E.coli* (EIEC) dan Diffusely Adherent *E.coli* (DAEC) (Zhang *et al.*, 2016).

Pasangan primer yang digunakan dalam reaksi PCR ini memiliki sekuen yang spesifik terhadap gen *aidA* pengkode protein adhesin *E.coli*. Gen *aidA* secara alami ditemukan pada strain Enteraggative *E.coli* (EAEC) O126:H127 yang menyebabkan penyakit diare pada anak (Sherlock *et al.*, 2004). Strain Enteraggative *E.coli* (EAEC) saat ini diketahui menjadi penyebab diare persisten pada anak, diare pada wisatawan, dan diare terkait penyakit AIDS di negara berkembang dan industri (Zhang *et al.*, 2016).

Protein *aidA* merupakan salah satu type protein adhesin yang berperan dalam penempelan bakteri *E.coli* pada permukaan sel manusia. Protein *aidA* termasuk jenis auto-transporter protein yang terkait dengan faktor virulensi *E.coli*. Protein ini memuat semua informasi yang diperlukan untuk proses transfer molekul dalam sistem membran bakteri (Sherlock *et al.*, 2004). Protein ini juga digunakan untuk tampilan permukaan enzim, sebagai inhibitor enzim, antigen yang potensial untuk perkembangan vaksin, dan berbagai aplikasi lainnya (Gustavsson *et al.*, 2011).

Pada penelitian ini gen *aidA* berhasil diisolasi dari DNA *E.coli* penyebab diare wisatawan dengan ukuran pita DNA sekitar 585 bp. Gen *aidA* pada penelitian-penelitian sebelumnya berhasil diidentifikasi pada *E.coli* penyebab diare pada ternak. Ravi, (2006) dalam

penelitiannya berhasil mengisolasi gen *aidA* dari *E.coli* penyebab diare pada bayi dengan ukuran DNA sesuai dengan hasil penelitian ini. Kanengoni et al. (2017) juga menemukan strain *E.coli* penyebab diare pada bayi yang positif mengandung gen *aidA* berdasarkan hasil PCR dengan ukuran 585 bp. Torres et al. (2005) melaporkan bahwa protein *aidA* berperan sebagai faktor adhesi *E.coli* pada permukaan sel HeLa manusia. Hal ini menunjukkan bahwa gen *aidA* bersifat virulen dan mengekspresikan protein yang terkait dengan pathogenesis *E.coli* penyebab diare baik pada manusia maupun hewan ternak.

Berdasarkan hasil PCR dalam penelitian ini, terdapat 5 sampel yang mengindikasikan adanya strain *E.coli* patogen penyebab diare wisatawan di wilayah Ubud. Sampel *E.coli* dengan hasil negatif dapat berasal dari strain *E.coli* patogen lainnya yang juga mampu menimbulkan diare pada wisatawan. Identifikasi lebih lanjut terhadap sampel-sampel tersebut perlu dilakukan dengan menggunakan primer yang secara spesifik mengenali strain-strain *E.coli* patogen penyebab diare wisatawan

SIMPULAN

Kesimpulan

Sebanyak 20 (59 %) dari 34 penderita diare wisatawan di wilayah Ubud disebabkan oleh bakteri *E.coli*. DNA *E.coli* penyebab diare wisatawan berhasil diisolasi dengan ukuran pita DNA 12000-13000 bp. Hasil pemeriksaan dengan PCR didapatkan 5 isolat *E.coli* memiliki gen *aidA* pengkode protein transport dengan ukuran DNA sekitar 585 bp.

Saran

Perlu diidentifikasi lebih lanjut strain *E.coli* penyebab diare wisatawan dengan menggunakan primer terhadap gen-gen pengkode protein transport lainnya. Gen *aidA* pengkode protein transport *E.coli* yang didapatkan perlu dikarakterisasi lebih lanjut sebelum dilakukan kloning menggunakan plasmid yang sesuai dalam rangka pengembangannya sebagai kandidat vaksin sub-unit terhadap *E.coli* penyebab diare wisatawan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada Poltekkes Kemenkes Denpasar yang mendanai penelitian ini dengan surat kontrak penelitian No. DP.02.02/PPK/5376/2019 dan atas izin menggunakan fasilitas penelitian di laboratorium Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan. Kami juga mengucapkan terimakasih kepada Ubud Care Clinic, Gianyar atas izin pengambilan sampel penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

41. Ammazalorso, A. D., Zolnik, C. P., & Daniels, T. J. 2015. To beat or not to beat a tick: comparison of DNA extraction methods for ticks (Ixodes scapularis). PeerJ, 1–14.
40. Ani, L. S., & Suwiyoga, K. 2016. Traveler's diarrhea risk factors on foreign tourists in Denpasar Bali-Indonesia. 5(1), 152–156.
28. Antony, A. C., Paul, M. K., Silvester, R., Aneesa, P. A., Suresh, K., Divya, P. S., Paul, S., Fathima, P. A., & Abdulla, M. H. 2016. Comparative evaluation of EMB Agar and Hicrome E. coli Agar for Differentiation of Green Metallic Sheen Producing Non E. coli and Typical E. coli Colonies from Food and Environmental Samples. Journal of Pure and Applied Microbiology, 10(24).
- Bauch, J. de la C., & DuPon, H. L. 2011. New Developments in Traveler's Diarrhea. Gastroenterology & Hepatology, 7(2), 88–95.
- Connor, B. A. 2019. Travelers' Diarrhea. In Yellow Book. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Global Migration and Quarantine (DGMQ). <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/preparing-international-travelers/travelers-diarrhea>.
37. Das, S., Jayaratne, R., & Barrett, K. E. 2018. The Role of Ion Transporters in the Pathophysiology of Infectious Diarrhea. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 6(1).

- 35 Ericsson, C. D., Ke, S. H. I., Huang, D. B., Dupont, M. W., Adachi, J. A., Cabada, F. J. D. E. L. A., Taylor, D. N., Jaini, S., & Sandoval, F. M. (2007). Treatment of Travelers' Diarrhea: Randomized Trial Comparing Rifaximin, Rifaximin Plus Loperamide, and Loperamide Alone. *CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY*, 5, 451–456.
- Gebisa, E. S., Gerasu, M. A., & Leggese, D. T. 2019. A Review on Virulence Factors of Escherichia Coli. *Animal and Veterinary Sciences*. 7(3). 83–93.
- Gitaswari, D. A. I., & Budayanti, S. 2019. Identifikasi Subtipe Enterotoxigenic Escherichia coli dan Enteroaggregative Escherichia coli dari Spesimen Usap Dubur Penjamah Makanan di Denpasar Menggunakan Polymerase Chain Reaction. *E-Jurnal Medika Udayana*. 8(1). 7–11.
- 44 Gustavsson, M., Bäcklund, E., & Larsson, G. 2011. Optimisation of surface expression using the AIDA autotransporter. *Microbial Cell Factories*. 10(72). 1–10.
- 2 Juhas, M., & Ajioka, J. W. (2016). Integrative bacterial artificial chromosomes for DNA integration into the Bacillus subtilis chromosome. *Journal of Microbiological Methods*. 125. 1–7.
- 19 Kanengoni, A. T., Thomas, R., Gelaw, A. K., & Madoroba, E. 2017. Epidemiology and characterization of Escherichia coli outbreak on a pig farm in South Africa. *FEMS Microbiology Letters*. 364(3). 1–7.
- 42 Lupindu, A. M. 2017. Isolation and Characterization of Escherichia coli from Animals, Humans, and Environment. Licensee InTech.
- Masyeni, S., Sukmawati, H., Paramasatiari, L., Aryastuti, S. A., Somia, K. A., Kambayana, G., Astika, N., Duar, R., & Merati, T. P. 2017. Diarrhea Among International Travelers in Bali Indonesia: Clinical and Microbiological Finding. *International Journal of Travel Medicine and Global Health*. 5(3). 84–88.
- 9 Nesta, B., & Pizza, M. 2018. Vaccines Against Escherichia Coli. *Curr Top Microbiol Immunol*, 416, 213–242.
- 15 Olson, S., Hall, A., Riddle, M. S., & Porter, C. K. 2019. Travelers' diarrhea: update on the incidence, etiology and risk in military and similar populations – 1990-2005 versus 2005 – 2015, does a decade make a difference? *Trop Dis Travel Med Vaccines*. 5(1). 1–15.
- 1 Pitzurra, R., Steffen, R., Tschopp, A., & Mutsch, M. 2010. Diarrhoea in a large prospective cohort of European travellers to resource-limited destinations. *BMC Infect Dis*. 10(231). 1–9.
- 38 Radji, M., Puspaningrum, A., & Sumiati, A. 2010. Deteksi Cepat Bakteri Escherichia coli dalam Sampel Air dengan Metode Polymerase Chain Reaction Menggunakan Primer 16E1 dan 16E2. *Makara Sains*. 14(1). 39–43.
- Ravi, M. B. 2006. Pathogenesis and clinical significance of AIDA-I-positive E. coli in diarrhea of pigs. University of Saskatchewan.
- 43 Ravintheran, S. K., Sivaprakasam, S., Loke, S., Lee, S. Y., Manickam, R., Yahya, A., Croft, L., & Millard, A. 2019. Complete genome sequence of Sphingomonas paucimobilis AIMST S2, a xenobiotic-degrading bacterium. *Scientific Data*, 6(280), 1–6.
- 36 Riddle, M. S., Connor, B. A., Beeching, N. J., Dupont, H. L., Hamer, D. H., Kozarsky, P., Libman, M., Steffen, R., Taylor, D., Tribble, D. R., Vila, J., Zanger, P., & Ericsson, C. D. 2017. Guidelines for the prevention and treatment of travelers' diarrhea: a graded expert panel report. *Journal of Travel Medicine*, 24(1), 63–68.
- Saussure, P. P. H. De. 2009. Management of the Returning Traveler with Diarrhea. *Therap Adv Gastroenterol*. 2(6). 367–375.
- 12 Sherlock, O., Schembri, M. A., Reisner, A., & Klemm, P. 2004. Novel Roles for the AIDA Adhesin from Diarrheagenic Escherichia coli: Cell Aggregation and Biofilm Formation.

- Journal of Bacteriology*. 186(23). 8058–8065.
- Steffen, R. 2017. Epidemiology of Travellers' Diarrhea. *Journal of Travel Medicine*. 24(1). 2–5.
- Steffen, R. 2018. Emerging Options for the Management of Travelers' Diarrhea. *Gastroenterology & Hepatology*. 14(12).
- 8 Steffen, R., Hill, D. R., & DuPont, R. L. 2015. Traveler's Diarrhea: A Clinical Review. *JAMA*. 313(1). 71–80.
- 39 Tang, F., & Saier, M. H. 2014. Transport proteins promoting *Escherichia coli* pathogenesis. *Microb Pathog*. 41–55.
- 21 Torres, A. G., Zhou, X., & Kaper, J. B. 2005. Adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains to Epithelial Cells. *Infection And Immunity*. 73(1).18–29.
- 5 Vila, J., Vargas, M., Ruiz, J., Espasa, M., & Pujol, M. 2001. Susceptibility patterns of enteroaggregative *Escherichia coli* associated with traveller 's diarrhoea : emergence of quinolone resistance. *J Med Microbiol*. 50. 996–1000.
- Wahyuni, N. W. M. S., Wirawan, I. M. A., & Hendrayana, M. A. 2019. Risks factors for diarrhea among travellers visiting Bali. *Public Health and Preventive Medicine Archive (PHPMA)*, 7(2), 121–126.
- 3 Zhang, R., Gu, D., Huang, Y., Chan, E. W., Chen, G., & Chen, S. 2016. Comparative genetic characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* strains recovered from clinical and non-clinical settings. *Nature Publishing Group*. 1–9.

IDENTIFIKASI GEN PENYANDI PROTEIN TRANSPORT SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN SUBUNIT TERHADAP BAKTERI ESCHERICHIA COLI PENYEBAB DIARE WISATAWAN

ORIGINALITY REPORT

10%

SIMILARITY INDEX

8%

INTERNET SOURCES

9%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

content.sciendo.com

Internet Source

<1 %

2

www.haseloff-lab.org

Internet Source

<1 %

3

Erik J. Boll, Marc Stegger, Henrik Hasman, Louise Roer et al. " Emergence of enteroaggregative within the ST131 lineage as a cause of extraintestinal infections ", Cold Spring Harbor Laboratory, 2018

Publication

<1 %

4

dspace.aua.gr

Internet Source

<1 %

5

Gerardo Rojo Marcos, Juan Cuadros González, Alberto Arranz Caso. "Enfermedades infecciosas importadas en España", Medicina Clínica, 2008

Publication

<1 %

6

sinta2.ristekdikti.go.id

Internet Source

<1 %

7	Ronald F. Elsner. " <i>Chandra X - Ray Observatory Observations of the Globular Cluster M71</i> ", The Astrophysical Journal, 11/10/2008 Publication	<1 %
8	daj9cl0xcfutq.cloudfront.net Internet Source	<1 %
9	Min Li, Donglin Shi, Yanxiu Li, Yuyi Xiao, Mianmian Chen, Liang Chen, Hong Du, Wei Zhang. "Recombination of T4-like Phages and Its Activity against Pathogenic Escherichia coli in Planktonic and Biofilm Forms", Virologica Sinica, 2020 Publication	<1 %
10	Zachary Rivas, Ryan M. McCormack, Becky Adkins, George P. Munson. " CexE Is A Virulence Factor of And Present In Enteric Pathogens Of Humans ", Cold Spring Harbor Laboratory, 2018 Publication	<1 %
11	arzyabi.abzums.ac.ir Internet Source	<1 %
12	doi.org Internet Source	<1 %
13	jurnal.mdp.ac.id Internet Source	<1 %

14

Anjang Bangun Prasetyo, Eni Kusriani, Ruby Vidia Kusumah, Sawung Cindelasari, Siti Murniasih. "EFEKTIVITAS METODE TRANSFEKSI DALAM TRANSFER GEN PADA ZIGOT IKAN CUPANG ALAM (WILD BETTA), *Betta imbellis*", Jurnal Riset Akuakultur, 2013

Publication

<1 %

15

Courtney D. Petro, Jeffrey K. Duncan, Yuliya I. Seldina, Anna Allué-Guardia et al. "Genetic and Virulence Profiles of Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) Isolated From Deployed Military Personnel (DMP) With Travelers' Diarrhea", Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020

Publication

<1 %

16

www.scilit.net

Internet Source

<1 %

17

gamel.fk.ugm.ac.id

Internet Source

<1 %

18

ppjp.ulm.ac.id

Internet Source

<1 %

19

repository.up.ac.za

Internet Source

<1 %

20

Febrina Olivia Akerina. "Microbial contamination in smoked tuna at traditional market of Tobelo, North Halmahera,

<1 %

Indonesia", Akuatikisle: Jurnal Akuakultur, Pesisir dan Pulau-Pulau Kecil, 2018

Publication

21

acikerisim.aku.edu.tr

Internet Source

<1 %

22

pt.slideshare.net

Internet Source

<1 %

23

yudhiestar.blogspot.com

Internet Source

<1 %

24

Bruno Marchou. "Diarrhées du voyageur :
épidémiologie, prévention et conduite à
tenir", La Presse Médicale, 2013

Publication

<1 %

25

Mario Juhas, James W. Ajioka. "Integrative
bacterial artificial chromosomes for DNA
integration into the *Bacillus subtilis*
chromosome", Journal of Microbiological
Methods, 2016

Publication

<1 %

26

ojs.unm.ac.id

Internet Source

<1 %

27

repository.unand.ac.id

Internet Source

<1 %

28

Alya Limayem, Sarah Wasson, Mausam
Mehta, Anaya Raj Pokhrel, Shrushti Patil, Minh
Nguyen, Jing Chen, Bina Nayak. "High-

<1 %

Throughput Detection of Bacterial Community and Its Drug-Resistance Profiling From Local Reclaimed Wastewater Plants", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019

Publication

29

Mega Mirawati Mirawati, Estu Lestari Lestari. "PENGARUH PEMBERIAN KARBOL FUCHSIN DAN PEMANASAN SPUTUM SEBELUM PEMBUATAN SEDIAAN TERHADAP HASIL PEWARNAAN BTA", *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kesehatan*, 2017

Publication

<1 %

30

Nunik Tri Rahayu, Ai Sri Nurhasanah, Alfi Rumidatul, Feldha Fadhila, Yayan Maryana. "Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Ranting Sengon Dengan Pelarut Metanol Dan N-Heksana", *Jurnal Mitra Kesehatan*, 2020

Publication

<1 %

31

docplayer.info

Internet Source

<1 %

32

kimia.fmipa.unand.ac.id

Internet Source

<1 %

33

purnamiap.blogspot.com

Internet Source

<1 %

34

smilerire.wordpress.com

Internet Source

<1 %

35

Internet Source

<1 %

36

www.klinikum.uni-heidelberg.de

Internet Source

<1 %

37

edoc.hu-berlin.de

Internet Source

<1 %

38

eprints.ums.ac.id

Internet Source

<1 %

39

escholarship.org

Internet Source

<1 %

40

balimedicaljournal.org

Internet Source

<1 %

41

www.jove.com

Internet Source

<1 %

42

www.researchsquare.com

Internet Source

<1 %

43

Irina Lascu, Ioana Mereuță, Iulia Chiciudean, Hilde Hansen, Sorin Marius Avramescu, Ana - Maria Tănase, Ileana Stoica. " Complete genome sequence of C2.2: A new polyhydroxyalkanoate production candidate ", MicrobiologyOpen, 2021

Publication

<1 %

44

aem.asm.org

Internet Source

<1 %

Exclude quotes On

Exclude matches Off

Exclude bibliography On

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA BAKTERI ASAM LAKTAT DARI BLONDO VIRGIN COCONUT OIL TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* *by B 1*

Submission date: 15-May-2021 06:26AM (UTC+0700)

Submission ID: 1586354807

File name: Biomedika_2021.pdf (229.11K)

Word count: 4257

Character count: 26057

4

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA BAKTERI ASAM LAKTAT DARI BLONDO VIRGIN COCONUT OIL TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus*

ISOLATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY TEST OF LACTIC ACID BACTERIA FROM BLONDO VIRGIN COCONUT OIL AGAINST *Staphylococcus aureus*

Burhannuddin Rasyid, Ketut Meina Sandi, I Gede Sudarmanto, I Wayan Karta

Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar

Korespondensi: Burhannuddin Rasyid. Email : boerhannuddin@gmail.com

ABSTRAK

Blondo merupakan limbah produksi virgin coconut oil (VCO) dapat menjadi sumber untuk mengisolasi bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat mampu menghasilkan zat antimikroba yang dapat dikembangkan untuk mengobati kasus infeksi oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. Bakteri *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan infeksi mulai dari keracunan makanan, infeksi kulit hingga infeksi sistemik. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menguji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat dari blondo terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif cross-sectional. Sampel blondo diambil dari kelompok wanita tani di Tabanan yang berjumlah 16 sampel dengan pengambilan sampel secara simple random sampling. Bakteri diisolasikan menggunakan media selektif yaitu agar de Man Rogosa and Sharpe (MRS) dan identifikasi dengan uji pewarnaan gram, uji katalase dan uji produksi gas dari kosa. Uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa di dalam sampel blondo terdapat bakteri asam laktat dari genus *Lactobacillus* dan *Streptococcus*. Bakteri asam laktat yang diisolasi dari blondo VCO mampu menghambat *Staphylococcus aureus* dengan terbentuknya zona hambat berupa zona bening dengan rata-rata diameter zona hambat 11,02 mm. Zona hambat yang terbentuk termasuk dalam kategori sedang dan kuat, dengan zona hambat tertinggi yang dihasilkan yaitu 20,8 mm dan terendah yaitu 9,2 mm. Bakteri asam laktat dari blondo memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Kata Kunci: Bakteri Asam Laktat, Blondo, Potensi Antimikroba

ABSTRACT

Blondo is a waste from the virgin coconut oil (VCO) produced which can be used as a source of lactic acid bacteria. Lactic acid bacteria are capable of producing antimicrobial compounds to inhibit the growth of pathogenic bacteria. The purpose of this study was to isolate and test the antimicrobial activity of lactic acid bacteria from blondo against *Staphylococcus aureus* bacteria. This research is a descriptive cross-sectional. Blondo samples were taken at group of farm women in Tabanan agency, which was 16 samples with simple random sampling. Bacteria were isolated using selective medium de Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar and identified with gram staining test, catalase test and gas production test from kosa. The antimicrobial activity test of lactic acid bacteria was performed by using wells-diffusion method. Results of this study indicated there was lactic acid bacteria from the genus *Lactobacillus* and *Streptococcus* in the blondo sample. Lactic acid bacteria isolated from blondo were able to inhibit *Staphylococcus aureus* by forming a clear zone with an average diameter of inhibition zone was 11.02 mm. There were two antimicrobial potential category, medium and strong category, with the highest resulting inhibit zone was 20.8 mm and the lowest was 9.2 mm. Lactic acid bacteria from blondo had antimicrobials potential against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Lactic Acid Bacteria, Blondo, Antimicrobial Potential

How To Cite: Rasyid, B., Sandi, K., Sudarmanto, I., & Karta, I. (2021). ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA BAKTERI ASAM LAKTAT DARI BLONDO VIRGIN COCONUT OIL TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus*. Biomedika, 13(1), 56-67. doi:<https://doi.org/10.23917/biomedika.v13i1.11070>

DOI: <https://doi.org/10.23917/biomedika.v13i1.11070>

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan suatu problema yang rumit dan kompleks di bidang kesehatan. Infeksi disebut juga dengan *communicable disease* atau *transmissible disease* terjadi apabila mikroorganisme patogen masuk dan mengalahkan sistem pertahanan tubuh (James *et al.*, 2008). Mikroorganisme patogen tersebut salah satunya yaitu *Staphylococcus aureus* yang dapat menyebabkan keracunan makanan akibat enterotoksin yang dihasilkan. Enterotoksin ini dapat stabil pada suhu tinggi dan cepat resisten terhadap zat antimikroba sehingga menimbulkan permasalahan dalam tata laksana pengobatan (Brooks *et al.*, 2010).

Penggunaan antibiotik masih paling dominan digunakan sebagai pengobatan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri (Sumarjo, 2009). Tidak terkendalinya penggunaan antibiotik untuk pengobatan infeksi menimbulkan kasus baru di bidang kesehatan. Kemudahan dalam membeli obat antibiotik di apotek tanpa disertai resep dokter dan kurangnya informasi mengenai pemilihan serta penggunaan antibiotik yang tepat, telah berkontribusi terhadap terjadinya resistensi.

Saat ini bahan alam mulai kembali digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan. Eksplorasi pengobatan lainnya yang dilakukan mulai dari bahan alam bahkan sampai ke produk sampingan atau limbah yang tidak dimanfaatkan penggunaannya.

Blondo merupakan limbah dari proses pembuatan *Virgin Coconut Oil* (VCO) yang tidak mengalami pengolahan lebih lanjut. Kebanyakan limbah blondo dibuang begitu saja atau beberapa orang hanya memanfaatkannya kembali menjadi minyak goreng. Limbah blondo ini memiliki kandungan nutrisi yang cukup tinggi diantaranya mengandung karbohidrat dan protein yang cukup tinggi, lemak, mineral, serta asam lemak essensial seperti asam oleat, linoleat, linolenat serta bakteri yang menguntungkan yaitu bakteri asam laktat (Haerani, 2010; Murtius *et al.*, 2012). Pertumbuhan bakteri asam laktat pada blondo didukung oleh faktor-faktor tertentu seperti nutrisi pada santan utamanya yaitu karbohidrat serta kondisi lingkungan yang sesuai (Florou-Paneri *et al.*, 2013).

Bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif yang memiliki karakteristik berbentuk batang atau kokus, tidak membentuk spora, menghasilkan asam laktat serta

menghasilkan substansi antimikroba diantaranya asam organik, bakteriosin, hidrogen peroksida, karbondioksida, dan alkohol (Lahtinen *et al.*, 2012). Bakteri asam laktat umumnya dimanfaatkan di bidang pangan yakni pada makan berfermentasi yang digunakan sebagai pengganti bahan pengawet kimia (biopreservatif) pada bahan makanan guna memperpanjang umur simpan produk (Kapoor, 2011). Bakteri asam laktat juga dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan, salah satu contohnya yaitu sebagai minuman probiotik. Bakteri asam laktat jenis *Lactobacillus casei* telah dimanfaatkan sebagai starter bakteri dalam pembuatan ³⁴minuman probiotik dari air kelapa muda. Fungsi starter bakteri pada ³⁴minuman probiotik adalah untuk menjaga kesehatan tubuh, menstimulasi respons kekebalan, dan mengurangi bakteri patogen dalam usus (Yanuar dan Sutrisno, 2015).

Potensi bakteri asam laktat sebagai antimikroba telah banyak diuji oleh beberapa peneliti. Isolat bakteri asam laktat asal dua hari fermentasi kakao varietas forester memiliki sifat antibakteri terhadap lima bakteri patogen (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*) dengan menghasilkan

diameter daya hambat berkisar 7-12 mm (Urnemi *et al.*, 2011). Bakteri asam laktat hasil isolasi dari berbagai sumber nabati dan bahan berbasis susu memiliki aktivitas antagonistik terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli* (Susanti *et al.*, 2007).

Berbagai penelitian yang telah dilakukan untuk menemukan sumber dari bakteri asam laktat, diharapkan dapat dikembangkan lebih lanjut dalam proses penemuan bahan antimikroba baru. Berdasarkan hal tersebut, maka dalam penelitian ini diuji aktivitas antimikroba ²⁶bakteri asam laktat yang ²⁶diisolasi dari sampel blonde terhadap salah satu bakteri patogen yakni *Staphylococcus aureus*

METODE

²³Jenis penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan pendekatan *cross sectional*. Bakteri asam laktat yang diuji diisolasi dari 16 sampel blonde yang dihasilkan oleh kelompok wanita tani, Desa Tengkidak, Kecamatan Penebel, Kabupaten Tabanan, Bali. ²²Sampel diambil dengan teknik *probability sampling* secara *simple random sampling* melalui teknik acak sederhana.

⁸Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu neraca analitik (Radwag),

hotplate stirrer (Jisico), autoklaf (TOMY SX-500), pipet ukur steril (Iwaki-Pyrex®), oven (Wegnac), Biosafety Cabinet (Biobase), Mc Farland densitometer (Biosan), standar Mc Farland (Prolab), mikropipet (Socorex) inkubator (Esco), mikroskop binokuler (Olympus).

Bahan-bahan yang digunakan antar lain: media Muller Hinton Agar (MHA) (Oxoid), isolat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ¹⁴ *De Man Rogosa and Sharpe* (MRS) Agar (Oxoid), *De Man Rogosa and Sharpe* (MRS) Broth (Oxoid), pewarna Gram, minyak emersi, larutan hidrogen peroksida, alkohol 70%, NaCl fisiologis steril, paper disk kosong, paper disk antibiotik amoksisilin (sebagai kontrol kerja yang efektif ⁶⁴ menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*), dan aquades steril.

Jenis ⁵¹ data yang dikumpulkan adalah data primer meliputi data mengenai hasil isolasi bakteri asam laktat dari sampel blondo dan hasil uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat terhadap *Staphylococcus aureus*. Data dikumpulkan melalui pemeriksaan laboratorium, yaitu dengan teknik kultur dan pengukuran ⁴⁷ aktivitas antimikroba dengan metode difusi

sumuran. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

Sampel blondo diambil pada bagian atas serta bagian antara minyak dan air menggunakan spatula dan dimasukan secara aseptis ke dalam botol sampel steril. Sampel blondo diencerkan menggunakan garam fisiologis (NaCl 0,85% steril) dengan rasio 1:9. Sampel selanjutnya diinokulasikan pada media MRS agar dengan metode *streak plate*, kemudian ¹⁹ diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh selanjutnya ⁵ diidentifikasi dengan pewarnaan gram, uji katalase, dan uji produksi gas dari glukosa.

Uji aktivitas antimikroba dilakukan pada media MHA. Koloni bakteri *Staphylococcus aureus* usia 24 jam diambil beberapa ose kemudian disuspensikan ² ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl fisiologis steril sebanyak 5 mL. Kekeruhan suspensi ¹⁷ dibandingkan dengan standar kekeruhan *Mc Farland* 0,5% yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL pada alat *Mc Farland densitometer*. Swab kapas steril disiapkan dan ⁵⁸ dicelupkan ke dalam suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*, ² kemudian digoreskan merata pada permukaan media MHA, didiamkan selama 5-15 menit agar suspensi dapat meresap ke dalam media.

Sumuran dibuat pada media MHA dengan menggunakan alat pembuat sumur dengan diameter sumuran sama dengan diameter cakram. Masing-masing sumuran kemudian ditambahkan dengan 20 µl suspensi bakteri asam laktat usia 24 jam yang dikultur pada media MRS Broth. Media MHA ¹⁰ tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur untuk menentukan aktivitas antimikroba bakteri asam laktat terhadap *Staphylococcus aureus*. Sebagai kontrol negatif digunakan media MRS broth steril yang dimasukkan ke dalam sumuran. Sedangkan kontrol positif digunakan cakram antibiotik amoksisilin yang ditempelkan pada media MHA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur bakteri asam laktat dari sampel ³blondo dilakukan pada media MRS agar yang merupakan media selektif untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Hasil kultur bakteri asam laktat ¹⁶dapat dilihat pada gambar 1 di bawah ini :



⁴⁶**Gambar 1.** Koloni bakteri yang tumbuh pada media MRS Agar (Sumber: Data Primer, 2018)

Berdasarkan gambar 1 koloni bakteri yang tumbuh pada media MRS agar memiliki karakteristik berbentuk bulat, elevasi cembung, berwarna putih dan cream, serta tepian yang rata. Bakteri asam laktat dapat diisolasi dari berbagai sampel yakni susu fermentasi, sawi fermentasi dan saluran pencernaan ikan nila, dengan karakteristik koloni pada media pertumbuhan yaitu berwarna putih, cream, cream kekuningan sampai kuning, bentuk bulat dengan tepian rata serta elevasi cembung dan rata (Susanti *et al.*, 2007). Isolasi bakteri asam laktat dari yoghurt juga menunjukkan karakteristik yang serupa yaitu berbentuk bulat, berwarna cream, kuning muda dan putih kekuningan, tepian rata, serta elevasi cembung dan datar (Riadi *et al.*, 2017).

⁶³Koloni bakteri yang tumbuh pada media MRS agar kemudian diidentifikasi dengan pewarnaan gram, uji katalase, dan uji produksi gas dari glukosa. Hasil identifikasi koloni ¹⁸dapat dilihat pada tabel 1, gambar 2 dan 3.

Tabel 1. Hasil Identifikasi Bakteri Asam Laktat Dari Sampel Blondo

Uji	Jumlah (sampel)	Prosentase (%)
Pewarnaan Gram:		
- Gram positif	16	100
- Gram negatif	0	0
Bentuk sel:		
- Basil	15	93,75
- Kokus	1	6,25

Katalase:		
- Negatif	16	100
- Positif	0	0
Produksi gas dari glukosa:		
- Terdapat gas	2	12,5
- Tidak terdapat gas	14	87,5

(Sumber : Data Primer, 2018)



Gambar 2. Hasil pewarnaan Gram BAL isolat Blondo



Gambar 3. Hasil uji katalase BAL isolat Blondo

Berdasarkan tabel 1 di atas, dari hasil pewarnaan Gram terhadap koloni bakteri yang tumbuh ditemukan bakteri yang bersifat gram positif (gambar 2) dengan hasil negatif pada uji katalase (gambar 3). Beberapa penelitian lain juga telah melaporkan hasil identifikasi bakteri asam laktat dengan karakteristik Gram positif dan katalase negative (Delvia *et al.*, 2015; Ismail dan Yulvizar, 2017; Riadi *et al.*, 2017).

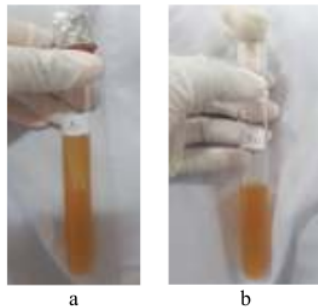
Bentuk sel dari bakteri asam laktat dapat membantu dalam mengetahui genus dari ⁴³ bakteri asam laktat. Bentuk sel bakteri asam

laktat yang ditemukan pada sampel blondo yaitu berbentuk basil (93,75%) dan kokus (6,25%) (tabel 1). Bentuk sel bakteri asam laktat dikelompokkan menjadi dua famili yaitu Streptococcaceae dan Lactobacillaceae. Famili Lactobacillaceae yang memiliki bentuk basil dan terdiri dari genus *Lactobacillus*. Famili Streptococcaceae yang memiliki bentuk bulat dan terdiri dari genus *Streptococcus*, *Leuconostoc* dan *Pediococcus* (Muzaifa, 2014)

Berdasarkan karakteristik bentuk selnya, bakteri asam laktat dengan bentuk basil diduga merupakan genus *Lactobacillus*. Sedangkan bakteri asam laktat dengan bentuk kokus, diduga dari genus *Streptococcus* dan *Leuconostoc*. Hal tersebut dikarenakan bakteri asam laktat yang ditemukan tersusun seperti rantai (Holzapfel and Wood, 2014). Namun untuk memastikan genusnya, maka dilakukan uji produksi gas dari glukosa.

Berdasarkan uji produksi gas dari glukosa yang ditunjukkan pada tabel 1, sejumlah 14 sampel (87,5%) yang diuji memiliki tipe fermentasi homofermentatif yang ditandai dengan tidak adanya gas pada tabung Durham (gambar 4a). Sedangkan dua sampel (12,5%) lainnya merupakan tipe heterofermentatif yang

³⁹ ditandai dengan terbentuknya gelembung gas pada tabung Durham (gambar 4b).



Gambar 4. Hasil uji produksi gas positif (a) dan produksi gas negatif (b)

Bakteri asam laktat dengan tipe fermentasi homofermentatif yaitu *Streptococcus*, *Pediococcus* dan *Lactobacillus*. Sedangkan bakteri asam laktat dengan tipe fermentasi heterofermentatif seperti *Leuconostoc* dan beberapa spesies dari *Lactobacillus* (Aritonang *et al.*, 2017).

Berdasarkan serangkaian uji untuk identifikasi bakteri asam laktat, dapat diketahui jenis bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi dari sampel blonde merupakan genus *Lactobacillus* dan genus *Streptococcus*. Penelitian lain yang mengisolasi bakteri asam laktat dari sampel blonde juga menemukan bakteri dari genus *Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp* (Murtius *et al.*, 2012). Jenis bakteri asam laktat lainnya yang dapat diisolasi dari sampel blonde antara lain *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. casei* dan *L. fermenti*, yang

seluruhnya berasal dari genus *Lactobacillus* (Mandei, 2016).

Berdasarkan hasil identifikasi dari 16 sampel blonde ditemukan 32 isolat ³⁷ yang merupakan bakteri asam laktat. Semua isolat bakteri asam laktat selanjutnya diuji aktivitas antimikroba ⁵² terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi sumuran. Hasil uji aktivitas antimikroba ²⁴ dapat dilihat pada tabel 2 dan gambar 4.

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat Isolat Blonde Terhadap *Staphylococcus Aureus*

No	Jumlah isolate	Aktivitas antimikroba	Rata-rata zona hambat
1	26	Mampu menghambat	11,02 (mm) ($\pm 5,7$)
2	6	Tidak mampu menghambat	0 mm

(Sumber : Data Primer, 2018)



Gambar 4. Hasil uji aktivitas antimikroba BAL isolat blonde terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

Adapun kategori aktivitas antimikroba ⁷ yang dihasilkan oleh 26 isolat bakteri asam laktat yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ²⁷ ditunjukkan pada tabel 3 di bawah ini :

Tabel 3. Kategori Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat Isolat Blondo Terhadap *Staphylococcus Aureus*

No	Kategori Daya Hambat	Jumlah (isolat)	Prosentase (%)
1	Sedang	3	11,54
2	Kuat	23	88,46
	Total	26	100

(Sumber : Data Primer, 2018)

Berdasarkan Tabel 2 di atas, sebanyak 26 isolat (81,25%) bakteri asam laktat mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antimikroba bakteri asam laktat tersebut ditandai dengan adanya zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran pada media MHA yang berisi suspensi bakteri asam laktat. Zona bening tersebut menandakan adanya aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

Zona bening yang dibentuk oleh setiap isolat bakteri asam laktat menunjukkan hasil yang berbeda-beda dengan rata-rata diameter yaitu 11,02 mm. Hasil zona bening tertinggi ditunjukkan oleh isolat bakteri G11 sebesar 20,8 mm (gambar 4). Sedangkan zona bening yang terendah yang dihasilkan yaitu sebesar 9,2 mm yang ditunjukkan oleh isolat A21. Perbedaan zona bening yang terbentuk dapat disebabkan oleh kemampuan bakteri asam laktat dalam menghasilkan zat antimikroba, jenis dan jumlah zat antimikroba yang dihasilkan serta umur biakan bakteri (Riadi *et al.*, 2017)

Kategori antimikroba berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk digolongkan ke dalam kategori kuat (88,46%) dan sedang (11,54%) (Tabel 3). Kategori antimikroba berdasarkan diameter zona bening yang dihasilkan yaitu sangat kuat dengan diameter >20 mm, kuat diameter antara 11-20 mm, sedang dengan diameter antara 6-10 mm dan lemah ≤5 mm (Surjowardojo *et al.*, 2015). Bakteri asam laktat yang diisolasi masing-masing dari fermentasi biji kakao (Ismail & Yulvizar, 2017) dan bekasam (Desniar *et al.*, 2012) juga mampu menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dengan kategori kuat.

Berdasarkan tipe fermentasinya, bakteri asam laktat dapat menghasilkan zat antimikroba yang berbeda-beda. Tipe homofermentatif memproduksi zat antimikroba berupa asam laktat sebagai produk utama dari metabolisme glukosa. Sedangkan bakteri asam laktat heterofermentatif selain menghasilkan asam laktat juga menghasilkan asam asetat, bakteriosin karbondioksida, hidrogen peroksida dan alkohol (Lahtinen *et al.*, 2012).

Dengan beragamnya senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat heterofermentatif maka diameter zona hambat yang dibentuk akan lebih besar dari tipe

homofermentatif. Namun dalam penelitian ini isolat dengan kode B11, B12, B31 dan B32 yang merupakan tipe heterofermentatif, ⁴¹ zona hambat yang terbentuk terhadap *Staphylococcus aureus* tidaklah lebih besar dari tipe homofermentatif. Hal ini disebabkan karena konsentrasi dari beberapa zat antimikroba yang dihasilkan jumlahnya sedikit dan juga karena sifat karakteristik dari bakteri *Staphylococcus aureus*.

⁷ Hidrogen peroksida yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat heterofermentatif mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menghancurkan enzim, mengubah sifat protein, dan mengganggu membran dari mikroorganisme (Maczulak, 2011). Namun karena karakteristik dari bakteri *Staphylococcus aureus* yang memiliki enzim katalase, membuat hidrogen peroksida ini tidak dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* (Brooks *et al.*, 2010).

Mekanisme karbondioksida dalam menghambat bakteri belum diketahui secara pasti. Karbondioksida diduga mampu menyebabkan kondisi lingkungan menjadi anaerob atau kadar oksigen menjadi sedikit (Siregar, 2010). Kondisi yang anaerob ini dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri. Namun bakteri *Staphylococcus aureus* diketahui bersifat

anaerob fakultatif yang mampu hidup baik ada maupun tidak ada oksigen, sehingga karbondioksida tidak dapat bekerja secara maksimal dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* (Brooks *et al.*, 2010).

Kemampuan bakteri asam laktat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* sebagian besar karena adanya asam organik yakni asam laktat dan ¹¹ asam asetat. Asam laktat merupakan produk utama dari proses metabolisme glukosa oleh ¹¹ bakteri asam laktat. Selama 24 jam inkubasi, konsentrasi asam laktat yang diproduksi yaitu berkisar 16,692-20,620 g/L dan akan meningkat seiring dengan lamanya waktu inkubasi (Desnir *et al.*, 2012). Jumlah produksi asam organik yang tinggi, membuat asam organik ini mampu menembus membran bakteri yang menyebabkan anion asam lemah dan zat antimikroba lainnya menumpuk di sitoplasma, sehingga mengganggu proses metabolisme dari *Staphylococcus aureus* (Lahtinen *et al.*, 2012). Produksi asam laktat yang terlalu tinggi juga menyebabkan penurunan pH pada media. Asam laktat dan penurunan pH secara sinergis bekerja sama dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*. Penurunan pH menjadi 3–4,5 secara tidak langsung membantu ³⁰ mengganggu aktivitas enzim sehingga sel

Staphylococcus aureus tidak mampu melakukan aktivitas metabolismenya (Sutrisna *et al.*, 2017).

Keberhasilan zat antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat juga tergantung pada struktur dinding sel bakteri yang dihambat. Struktur dinding sel akan berpengaruh pada ketahanan suatu bakteri terhadap zat antimikroba. Dalam penelitian ini bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan merupakan bakteri Gram positif dengan struktur dinding sel yang lebih sederhana dibandingkan bakteri Gram negatif sehingga lebih rentan terhadap aktivitas antimikroba (Brooks *et al.*, 2010)

Aktivitas antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang diisolasi dari sampel blonde dapat menjadi informasi baru mengenai limbah yang tidak selamanya memberikan efek yang buruk. Kemampuan bakteri asam laktat yang diisolasi dari blonde dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, dapat dimanfaatkan sebagai starter bakteri dalam pembuatan minuman probiotik, namun perlu dilakukan tahap uji lebih lanjut yaitu hitung koloni bakteri asam laktat, uji ketahanan pH dan garam empedu.

Penghitungan koloni bakteri asam laktat erat kaitannya dengan jumlah zat antimikroba yang akan dihasilkan. Semakin banyak jumlah koloni bakteri asam laktat maka semakin banyak zat antimikroba yang dihasilkan. Hasil penelitian lain melaporkan jumlah koloni bakteri asam laktat yang diisolasi dari blonde VCO berjumlah 5×10^9 CFU/ml. Jumlah tersebut cukup digunakan sebagai starter bakteri dalam pembuatan minuman probiotik (Murtius *et al.*, 2012).

SIMPULAN DAN SARAN

Bakteri asam laktat yang diisolasi dari sampel blonde mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* (81,25%). Rata-rata diameter zona hambat yaitu 11,02 mm, diameter tertinggi yaitu 20,08 mm dan terendah yaitu 9,2 mm. Aktivitas antimikroba bakteri asam laktat terhadap *Staphylococcus aureus* termasuk ke dalam kategori sedang sebanyak 11,54% dan kuat sebanyak 88,46%.

Bakteri asam laktat yang diisolasi dari blonde diharapkan dapat digunakan lebih lanjut sebagai salah satu starter bakteri dalam pembuatan minuman probiotik setelah dilakukan uji tahap lanjut yaitu hitung koloni bakteri asam laktat, uji ketahanan pH dan garam empedu.

DAFTAR PUSTAKA

- 29 Aritonang, S. N., Roza, E., Rossi E., Purwati, E., and Husmaini, H. 2017. Isolation and identification of lactic acid bacteria from okara and evaluation of their potential as candidate probiotics. *Pakistan Journal of Nutrition*. 16(8). Pp: 618–628. doi: 10.3923/pjn.2017.618.628.
- 33 Brooks, G. F., Carol, K. C., Butel, J.S., Morse, S.A., Mietzner, T.A. Jawetz, M.A. 2010. *Medical Microbiology*. 25th Ed. New York: Mc Graw Hil.
- 59 Delvia, F., Fridayanti, A. dan Ibrahim, A. 2015. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (Bal) Dari Buah Mangga (*Mangifera indica* L.). 1(2). Pp: 114–20. doi: 10.25026/mpc.v1i1.16.
- 65 Desniar, Rusmana, I., Suwanto, A., dan Mubarik, N.R. 2012. Senyawa Antimikroba Yang Dihasilkan Oleh Bakteri Asam Laktat Asal Bekasam. *Jurnal Akuatika Indonesia*. 3(2). Pp: 135–45.
- 42 Florou-Paneri, P., Christaki, E. and Bonos, E. 2013. Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purpose in Kongo, M. (ed.). *Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients*. InTech. Pp: 589–614. doi: 10.5772/47766.
- 15 Haerani. 2010. Pemanfaatan Limbah Virgin Coconut Oil (Blondo). *Jurnal MKMI*, 6(4). Pp: 244–48.
- 35 Holzapfel, W. H. and Wood, B. J. B. (2014) *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. New York: John Wiley and Sons. doi: 10.1002/9781118655252.ch19.
- Ismail, Y. S. and Yulvizar, C. 2017. Isolasi, Karakterisasi dan Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Bioleuser*. 1(2). Pp: 45–53.
- 50 James, J., Baker, C. and Swain, H. 2008. *Prinsip-Prinsip Sains untuk Keperawatan*. Edited by A. Safitri and R. Astikawati. Jakarta: Erlangga.
- 20 Kapoor, K. 2011. *Illustrated Dictionary of Microbiology*. New Delhi: Oxford Book Company. doi: 10.1038/nchembio.618.
- 40 Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., and von-Wright, A. 2012. *Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects*. 4th edn. New York: CRC Press.
- Maczulak, A. 2045. *Encyclopedia of Microbiology*. United States of America: Facts On File, Inc.
- Mandei, J. H. 2016. Pemanfaatan Blondo sebagai Starter dalam Pembuatan Yogurt. *Buletin Palma*. 16(1). p. 66. doi: 10.21082/bp.v16n1.2015.66-76.
- Murtius, W. S., Kasim, A. and Sayuti, K. 2012. Pemanfaatan Blondo Sebagai Starter Dalam Pembuatan Minuman Probiotik. *Universitas Andalas*. 15(2). Pp: 129–39.
- 66 Muzaifa, M. 2014. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Indigenous dari Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* L.). *Jurnal Sagu*, 13(1). Pp: 8–13. Available at: <http://ejournal.unri.ac.id/index.php/JSG/article/view/2130>.
- Riadi, S., Situmeang, S. M. . and Musthari, M. 2017. Isolasi dan Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Yoghurt Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. *Jurnal Biosains*, 3(3). p. 144. doi: 10.24114/jbio.v3i3.8302.
- Siregar, J. A. 2010. *Pengaruh Co2 (Karbon dioksida) Murni Terhadap Pertumbuhan Mikroorganisme Pada Produk Minuman Sprite di PT. Coca Cola Bottling Indonesia Unit Medan*. Medan.
- 6 Sumarjo, D. 2009. *Pengantar Kimia: Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata I Fakultas Bioeksakta*. Edited by A. Hanif and J Manurung. Jakarta: EGC.
- Surjowardojo, P. 1 Susilorini, T. and Panjaitan, A. 2015. Daya Hambat Jus Kulit Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia*

coli Penyebab Mastitis Pada Sapi Perah', *TERNAK TROPIKA Journal of Tropical Animal Production*. 16(2). Pp: 30–9. doi: 10.21776/ub.jtapro.2015.016.02.5.

61 Susanti, I., Kusumaningtyas, R. W. and Illaningsy, F. 2007. Probiotic Characteristics of lactic acid Bacteria as Candidate for Functional Food. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 18(2). Pp: 89–95.

57 Sutrisna, R., Ekowati, C. N. and Sinaga, E. 2017. Pengaruh pH terhadap Produksi Antibakteri oleh Bakteri Asam Laktat dari Usus Itik Effect of pH on Production

1 Antibacterial by Lactic Acid Bacteria From Gut Duck. 15(3). Pp: 234–8.

8 Urnemi, Syukur, S., Purwati, E., Ibrahim, S., dan Jamsari .2011. Potensi Bakteri Asam Laktat dalam Menghasilkan Bakteriosin sebagai Antimikroba dan Pengukuran Beratmolekulnya Dengan SDS-PAGE dari Isolat Fermentasi Kakao. *Jurnal Riset Kimia*. 4(2). Pp: 94–100.

60 Yanuar, S. E. and Sutrisno, A. 2015. Minuman Probiotik dari Air Kelapa Muda dengan Starter Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus casei*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(3). Pp: 909-17.

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA BAKTERI ASAM LAKTAT DARI BLONDO VIRGIN COCONUT OIL TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus*

ORIGINALITY REPORT

15%

SIMILARITY INDEX

13%

INTERNET SOURCES

9%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

ipi.portalgaruda.org

Internet Source

<1 %

2

journal.uta45jakarta.ac.id

Internet Source

<1 %

3

Christy Purukan, Jainer Pasca Siampa, Trina Ekawati Tallei. "Enkapsulasi Bakteri Asam Laktat Hasil Fermentasi Buah Salak (*Salacca zalacca*) Lokal Menggunakan Aginat dengan Pewarna Kembang Sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.)", JURNAL BIOS LOGOS, 2020

Publication

<1 %

4

sintadev.ristekdikti.go.id

Internet Source

<1 %

5

hortiku.blogspot.com

Internet Source

<1 %

6

Lale Budi Kusuma Dewi, Ida Bagus Rai Wiadnya, Iswari Pauzi. "Analisis Kesadahan Air Alkali Yang Beredar Di Kota Mataram Nusa

<1 %

Tenggara Barat", Jurnal Analisis Medika
Biosains (JAMBS), 2019

Publication

7	harfinad24090112.wordpress.com	<1 %
Internet Source		
8	scholar.unand.ac.id	<1 %
Internet Source		
9	www.headwiqlissundy.com	<1 %
Internet Source		
10	Khusnul Qotimah, Eko Nurcahya Dewi, Lukita Purnamayati. "Karakteristik mutu edible film karagenan dengan penambahan minyak atsiri bawang putih (Allim sativum) pada produk pasta ikan", Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia, 2020	<1 %
Publication		
11	asrioktavian.wordpress.com	<1 %
Internet Source		
12	obsesi.or.id	<1 %
Internet Source		
13	repozitorij.unizg.hr	<1 %
Internet Source		
14	"Organisms and recommended media", International Journal of Food Microbiology, 1987	<1 %
Publication		

- | | | |
|----|---|------|
| 15 | I Setyaningsih, P Mahmudah, W Trilaksani, K Tarman, J Santoso. "Spirulina biscuit formulation with coconut cream substitution and its shelf life estimation", IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2020
Publication | <1 % |
| 16 | ejournal.undip.ac.id
Internet Source | <1 % |
| 17 | eprints.poltekkesjogja.ac.id
Internet Source | <1 % |
| 18 | www.bppsdmk.or.id
Internet Source | <1 % |
| 19 | Samsul Rizal, Maria Erna, Fibra Nurainy, Artha Regina Tambunan. "Karakteristik Probiotik Minuman Fermentasi Laktat Sari Buah Nanas dengan Variasi Jenis Bakteri Asam Laktat", Jurnal Kimia Terapan Indonesia, 2016
Publication | <1 % |
| 20 | Wuri Marsigit, Helmiyetti Helmiyetti. "AVAILABILITY OF RAW MATERIAL, NUTRIENTS CONTENT, PROBIOTIC POTENCIAL AND SHELF LIFE OF REJANG LEBONG'S SALTED MUSTARD AS AN AGROINDUSTRY PRODUCT", Jurnal Agroindustri, 2018
Publication | <1 % |
| 21 | jurnalbidankestrad.com
Internet Source | <1 % |

22	repository.unusa.ac.id Internet Source	<1 %
23	tiyut.wordpress.com Internet Source	<1 %
24	www.ejurnal.stmik-budidarma.ac.id Internet Source	<1 %
25	www.jualbenihmurah.com Internet Source	<1 %
26	W L Barus, Z Bachruddin, C Hanim, L M Yusiati. "Effect of yellow sweet potato extract (Ipomoea batatas L.) as a prebiotic source for the kinetics of fermentation and the production of lactic acid by Lactobacillus paracasei", IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021 Publication	<1 %
27	abdatech.blogspot.com Internet Source	<1 %
28	digilib.unhas.ac.id Internet Source	<1 %
29	dosen.unand.ac.id Internet Source	<1 %
30	journal.fk.unpad.ac.id Internet Source	<1 %
31	journal.unj.ac.id	

<1 %

32

journals.im.ac.cn

Internet Source

<1 %

33

www.ajol.info

Internet Source

<1 %

34

www.coursehero.com

Internet Source

<1 %

35

www.ifrj.upm.edu.my

Internet Source

<1 %

36

Acika Sumual, Fatimawali Fatimawali, Trina E. Tallei. "UJI ANTIBAKTERI DARI BAKTERI ASAM LAKTAT HASIL FERMENTASI SELADA ROMAIN (*Lactuca sativa* var. *longifolia* Lam.)", PHARMACON, 2019

Publication

<1 %

37

Cahya Setya Utama. "MICROBIOLOGY STUDY OF FERMENTED WHEAT POLLARDS WITH THE ADDITION OF VITAMINS AND MINERALS", JURNAL PETERNAKAN NUSANTARA, 2020

Publication

<1 %

38

Engjinia Frenny Kandio, Adithya Yudistira, John M.R. Runtuwene. "ISOLASI BAKTERI ENDOFIT SIMBION DARI SPONGS *Stylissa* sp. DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI SERTA IDENTIFIKASI SECARA MOLEKULER

<1 %

MENGGUNAKAN GEN 16S rRNA", PHARMACON, 2021

Publication

39

Farida Ariani, Riris Lindiawati Puspitasari, Taufiq Wisnu Priambodo. "Pencemaran Coliform pada Air Sumur di Sekitar Sungai Ciliwung", JURNAL AL-AZHAR INDONESIA SERI SAINS DAN TEKNOLOGI, 2018

Publication

<1 %

40

Helmut König, Jürgen Fröhlich. "Chapter 1 Lactic Acid Bacteria", Springer Science and Business Media LLC, 2017

Publication

<1 %

41

Rafi'a Adinda Putri, Herny E.I. Simbala, Deby A. Mpila. "UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL BAWANG DAYAK (Eleutherine americana Merr) TERHADAP BAKTERI Staphylococcus aureus, Escherichia coli DAN Salmonella typhi", PHARMACON, 2020

Publication

<1 %

42

S.H.C. Sandes, L.B. Alvin, B.C. Silva, D.F. Zanirati, L.R.C. Jung, J.R. Nicoli, E. Neumann, A.C. Nunes. " species identification by amplified ribosomal 16S-23S rRNA restriction fragment length polymorphism analysis ", Beneficial Microbes, 2014

Publication

<1 %

43	Susi Lestari, Rinto Rinto, Siti Balqis Huriyah. "Peningkatan Sifat Fungsional Bekasam Menggunakan Starter Lactobacillus acidophilus", Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia, 1970 Publication	<1 %
44	aguskrisnoblog.wordpress.com Internet Source	<1 %
45	de.scribd.com Internet Source	<1 %
46	ejournal-balitbang.kkp.go.id Internet Source	<1 %
47	etd.unsyiah.ac.id Internet Source	<1 %
48	fptt.ru Internet Source	<1 %
49	pdfs.semanticscholar.org Internet Source	<1 %
50	perpusnwu.web.id Internet Source	<1 %
51	repository.ipb.ac.id:8080 Internet Source	<1 %
52	repository.pimedu.ac.id Internet Source	<1 %

53	repository.usu.ac.id Internet Source	<1 %
54	www.e-jurnal.com Internet Source	<1 %
55	Danu Purnomo, Pratiwi Apridamayanti, Rafika Sari. "Potensi antibakteri dari susu fermentasi dengan starter Lactobacillus casei terhadap Escherichia coli dan Staphylococcus aureus", Jurnal Cerebellum, 2021 Publication	<1 %
56	Indri Juliyarsi, Arief, Akmal Djamaan, Endang Purwati. "Characteristics based of edible film made from whey with isolated lactic acid bacteria from tempoyak as probiotics packaging", IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2019 Publication	<1 %
57	jiip.ub.ac.id Internet Source	<1 %
58	journal2.uad.ac.id Internet Source	<1 %
59	prosiding.farmasi.unmul.ac.id Internet Source	<1 %
60	thp.fp.unila.ac.id Internet Source	<1 %

61

Gemilang Lara Utama, Siska Meliana, Mohamad Djali, Tri Yuliana, Roostita L. Balia. "Probiotic Candidates Yeast Isolated from Dangke - Indonesian Traditional Fermented Buffalo Milk", *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2019

Publication

<1 %

62

Luciana G. Ruiz Rodríguez, Florencia Mohamed, Juliana Bleckwedel, Roxana Medina et al. "Diversity and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Wild Fruits and Flowers Present in Northern Argentina", *Frontiers in Microbiology*, 2019

Publication

<1 %

63

Ruslan A. Daeng, Azis Husen. "Analysis and identification of *Pseudomonas* sp. and molds on dried anchovy (*Stelophorus* sp) products produced by the people of Toniku Village, Halmahera Barat Regency, North Maluku Province", *Akuatikisile: Jurnal Akuakultur, Pesisir dan Pulau-Pulau Kecil*, 2019

Publication

<1 %

64

lordbroken.wordpress.com

Internet Source

<1 %

65

repository.pertanian.go.id

Internet Source

<1 %

Exclude quotes On

Exclude matches Off

Exclude bibliography On

UJI ANGKA KAPANG KHAMIR DAN IDENTIFIKASI *Aspergillus* *species* PADA JAMU KUNYIT DI DENPASAR SELATAN

by B 8

Submission date: 15-May-2021 06:33AM (UTC+0700)

Submission ID: 1586357281

File name: Meditory_2_2019.pdf (258.46K)

Word count: 3552

Character count: 20989

UJI ANGKA KAPANG KHAMIR DAN IDENTIFIKASI *Aspergillus species* PADA JAMU KUNYIT DI DENPASAR SELATAN

Kadek Dewi Amba Rahayu¹, I Nyoman Jirna², Burhannuddin³

^{1,2,3} Poltekkes Denpasar
nyomanjirna@gmail.com

Abstract:

Background: Jamu kunyit is one of the traditional medicine that is believed to cure some diseases and very popular by the community. Jamu kunyit can be reduced in quality if there were mold, yeast, and the presence of *Aspergillus*.

Purpose: This study is to determine the number of mold yeast, and identify *Aspergillus sp.* on jamu kunyit that sold in Denpasar Selatan.

Method: This study was descriptive by using cluster sampling technique. Jamu kunyit were cultured on SDA media, and the growing colonies were calculated to determine the value of the number mold and yeast. From the number a mold and yeast examination, there were 8 samples of jamu kunyit that exceeded standard (35%) and 15 samples of jamu kunyit in normal range (65%), 2 samples of jamu kunyit showed positive *Aspergillus sp.* and 21 samples of jamu kunyit negative *Aspergillus sp.* the type of *Aspergillus* found is *Aspergillus niger*.

Result: Many factors that can cause mold and yeast contamination are packaging, production, and storage.

Keyword : Jamu kunyit, the number of mold yeast, *Aspergillus sp.*

PENDAHULUAN

Denpasar Selatan merupakan salah satu kecamatan yang ada di kota Denpasar. Kecamatan ini terdiri atas enam kelurahan dan empat desa antara lain Kelurahan Renon, Kelurahan Sesetan, Kelurahan Pedungan, Kelurahan Sanur, Kelurahan Panjer, Kelurahan Serangan, Desa Sanur Kaja, Desa Sanur Kauh, Desa Sidakarya dan Desa Pamogan. Pada penelitian ini dipilih Denpasar Selatan karena kecamatan Denpasar Selatan memiliki jumlah penduduk yang cukup padat mencapai 279.640 jiwa¹

Dari data tersebut dapat dilihat bahwa penduduk di Denpasar Selatan cukup banyak sehingga banyak pula

ditemukan pedagang jamu di Denpasar Selatan dan banyak masyarakat Denpasar Selatan yang masih mengonsumsi jamu. Pedagang jamu di Denpasar Selatan dapat ditemukan di pinggir jalan maupun pedagang jamu gendong yang berkeliling. Berdasarkan survey yang telah dilakukan oleh peneliti bahwa di kelurahan Renon terdapat pedagang jamu sebanyak 8 pedagang, kelurahan Sesetan terdapat pedagang jamu sebanyak 7 pedagang, kelurahan Pedungan terdapat pedagang jamu sebanyak 6 pedagang, kelurahan Sanur tidak ditemukan pedagang jamu, kelurahan Panjer ditemukan pedagang jamu sebanyak 4 pedagang, kelurahan Serangan tidak ditemukan pedagang jamu, desa Sanur

Kaja ditemukan 1 pedagang jamu, desa Sanur Kauh ditemukan 1 pedagang jamu, desa Sidakarya ditemukan pedagang jamu sebanyak 7 pedagang dan desa Pamogan ditemukan pedagang jamu sebanyak 8 pedagang. Terdapat berbagai macam jamu yang dijual di Denpasar Selatan salah satunya adalah jamu kunyit.

Jamu kunyit sangat digemari karena memiliki segudang khasiat, seperti dapat memancarkan aura kecantikan, dapat digunakan sebagai obat keputihan, pereda nyeri ²⁸ haid, menghilangkan demam, diare, dispepsia (perut kembung, nyeri, mual, tidak nafsu makan), eksim dan borok, gatal akibat cacar air, radang amandel, radang rahim, radang usus buntu, hepatitis, radang gusi, tekanan darah tinggi, dan terlambat haid, memperlancar ASI, dan mengatasi amandel².

Jamu yang dikonsumsi dapat berubah mutunya apabila terdapat beberapa faktor luar seperti cahaya matahari, oksigen, penyerapan air, adanya serangga, dan jamur. Dengan adanya faktor yang dapat menurunkan mutu jamu maka penting untuk mengetahui faktor yang membantu melindungi kestabilan mutu jamu, seperti lama penyimpanan dan tempat penyimpanan jamu yang benar sehingga mutu jaminan dapat tercapai optimal.

Dalam penyimpanan obat tradisional dipersyaratkan agar disimpan pada suhu ruang yaitu pada suhu 25°C sampai 30°C, ¹⁵ disimpan ditempat kering (terhindar dari kelembaban) dan terlindung dari sinar matahari³.

Penentuan kualitas jamu dapat dilakukan dengan parameter mikrobiologi salah satunya yaitu menguji Angka Kapang Khamir, yang menunjukkan adanya cemaran kapang khamir dalam sediaan. Pengujian AKK dilakukan untuk menjamin bahwa sediaan tidak mengandung jamur dari batas yang telah ditetapkan karena keberadaan jamur pada sediaan dapat mempengaruhi stabilitas sediaan tersebut dan dapat menurunkan mutu jamu. Menurut BPOM RI No. 12 tahun 2014 tentang persyaratan obat tradisional bahwa cairan obat yang akan dikonsumsi tidak boleh mengandung Angka Kapang Khamir lebih dari 10³ koloni/mL. Jika ditemukan AKK dalam sampel jamu yang ⁹ diuji melebihi ambang batas yang telah ditentukan, maka sampel jamu tersebut tidak layak dikonsumsi karena berbahaya bagi kesehatan konsumen. Kondisi tersebut memungkinkan adanya pertumbuhan jenis kapang tertentu seperti jamur *Aspergillus species* (sp). Aflatoksin yang diproduksi oleh *Aspergillus sp.* bersifat toksik karena

dapat menyebabkan terjadinya sirosis dan karsinoma hati. Jumlah kapang dan khamir yang besar, dan terdapat adanya jamur *Aspergillus sp.* menunjukkan kemunduran dari mutu obat tradisional⁴.

Berdasarkan survey pendahuluan yang penulis lakukan, penjual jamu kunyit di kawasan Denpasar Selatan kurang higienis dilihat dari penggunaan botol penyimpanan jamu yang digunakan secara terus menerus sehingga pada mulut botol penyimpanan jamu masih menempel sisa-sisa jamu sebelumnya sehingga timbul kecurigaan tumbuhnya jamur pada botol penyimpanan jamu tersebut. Pada saat jamu dipanaskan dan dipindahkan kedalam botol jamu dan kemudian ditutup rapat akan menimbulkan adanya uap air yang dapat menjadi tempat tumbuhnya jamur pada botol jamu. Jamu kunyit yang beredar di Denpasar Selatan apabila tidak laku terjual maka jamu kunyit tersebut akan disimpan dalam waktu yang tidak ditentukan, sehingga timbul kecurigaan tumbuhnya jamur pada jamu tersebut mengingat bahwa jamur dapat tumbuh dengan cepat pada media yang lembab. Banyak ditemukan jamu kunyit yang tidak mencantumkan nomor registrasi BPOM dan tanggal kadaluarsa sehingga tidak diketahui secara pasti jamu kunyit

tersebut layak untuk dikonsumsi atau tidak.

Penelitian yang dilakukan tentang uji AKK terhadap dua pedagang yaitu dari pedagang satu diperoleh nilai AKK pada jamu kunyit sebanyak $4,6 \times 10^3$ koloni/mL, dan dari pedagang dua diperoleh nilai AKK pada jamu kunyit sebanyak $9,6 \times 10^2$ koloni/mL yang menunjukkan bahwa jamu tersebut tidak layak dikonsumsi karena jumlah Angka Kapang Khamirnya melebihi batas yang telah ditentukan⁵. Penelitian tentang identifikasi kapang pada empat sampel jamu yaitu jamu beras kencur, kunyit, sirih dan sambiloto, jenis kapang yang paling banyak ditemukan dari keempat sampel jamu tersebut adalah *Aspergillus niger* dan *Aspergillus flavus*⁶.

Berdasarkan observasi yang telah penulis lakukan, bahwa banyak jamu kunyit di Denpasar Selatan beredar secara bebas tanpa adanya ijin edar dan tidak melalui proses uji keamanan dan kualitas obat tradisional karena tidak mencantumkan nomor registrasi BPOM dan tanggal kadaluarsa, sehingga tidak dapat diketahui sediaan tersebut layak untuk dikonsumsi atau tidak. Maka, penulis tertarik untuk mengetahui kualitas jamu kunyit yang dijual di kawasan Denpasar Selatan dengan menggunakan parameter mikrobiologi

yaitu AKK dan identifikasi *Aspergillus sp.*

METODE

Penelitian ini menggunakan penelitian deskriptif. Pengambilan sampel dilakukan di Kecamatan Denpasar Selatan dan pengujian Angka Kapang Khamir serta identifikasi *Aspergillus sp.* dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Denpasar. Penelitian ini juga didukung dengan hasil observasi dan wawancara yang dilakukan pada saat pengambilan sampel. Sampel jamu kunyit yang digunakan merupakan seluruh jamu kunyit yang dijual oleh pedagang di Kecamatan Denpasar Selatan dengan jumlah sampel yang diambil adalah 23 sampel jamu kunyit, didapat dengan menggunakan teknik *cluster sampling*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Karakteristik objek penelitian

Jamu kunyit yang digunakan pada penelitian ini yaitu seluruh jamu kunyit, baik yang dijual dengan cara dituang pada saat itu juga oleh pedagang jamu gendong maupun jamu kunyit yang sudah dikemas dalam botol yang dijual oleh pedagang yang menetap. Pada

penelitian ini, jumlah sampel yang digunakan adalah 23 sampel jamu kunyit.

Jamu kunyit yang digunakan sebagai objek penelitian memiliki warna khas kunyit yaitu kuning, memiliki rasa pahit dan memiliki aroma khas kunyit dan cair. Beberapa pedagang jamu kunyit juga menambahkan variasi rasa yaitu dengan menambahkan madu atau asam jawa untuk mengurangi rasa pahit dari kunyit.

2. Uji Angka Kapang Khamir (AKK)

Berdasarkan hasil pemeriksaan terhadap 23 sampel jamu kunyit, terdapat 8 sampel jamu kunyit yang mengandung fungi melebihi standar (35%) dan terdapat 15 sampel jamu kunyit yang memenuhi standar (65%) yang kemudian dibandingkan dengan standar yang telah ditetapkan oleh BPOM RI Nomor 12 Tahun 2014 yang menyatakan bahwa obat tradisional tidak boleh mengandung fungi lebih dari 10^3 koloni/mL.

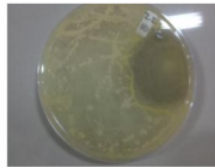
3. Identifikasi *Aspergillus sp.*

Berdasarkan hasil pemeriksaan terhadap 23 sampel jamu kunyit, sebanyak 2 sampel positif *Aspergillus sp.* (9%) dan 21 sampel negatif *Aspergillus sp.* (91%).

a. Identifikasi makroskopis

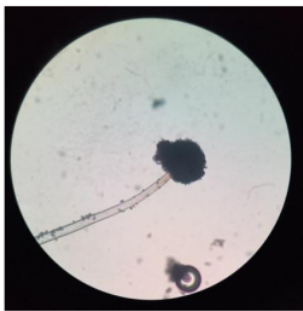


Hasil Makroskopis Koloni *Aspergillus sp.* sampel 10



Hasil Makroskopis Koloni *Aspergillus sp.* sampel 22

b. Identifikasi mikroskopis



Hasil Pengamatan Mikroskopis *Aspergillus sp.* pada perbesaran 40x, jenis *Aspergillus* yang ditemukan pada kedua sampel adalah *Aspergillus niger*.

4. Observasi dan Wawancara

a. Kemasan jamu kunyit

Berdasarkan jenis kemasan jamu yang digunakan, terdapat 13 jamu dengan menggunakan kemasan botol tidak berlabel (56%) dan 10 jamu dengan kemasan botol berlabel (44%).

b. Pemakaian Kemasan

Berdasarkan lama pemakaian kemasan jamu kunyit, didapatkan bahwa terdapat 10 jamu kunyit yang memakai

kemasan sekali pakai (56%) dan 13 jamu kunyit yang menggunakan kemasan yang dipakai berulang-ulang (44%).

c. Jenis Produksi Jamu Kunyit

Berdasarkan wawancara yang dilakukan kepada pedagang jamu kunyit mengenai jamu kunyit yang dijual di Denpasar Selatan, bahwa terdapat 13 jamu kunyit yang dibuat sendiri oleh pedagang jamu (56%), dan terdapat 10 jamu kunyit yang dibuat oleh orang lain sebagai hasil industri rumah tangga (44%).

d. Penyimpanan Jamu

Berdasarkan hasil wawancara terhadap pedagang jamu kunyit mengenai jamu kunyit yang dijual di Denpasar Selatan, bahwa terdapat 2 jamu kunyit yang apabila tidak laku terjual akan disimpan pada kulkas (8,7%), dan terdapat 21 jamu kunyit yang disimpan pada suhu ruang jika tidak laku terjual (91,3%).

B. PEMBAHASAN

1. Uji Angka Kapang Khamir

Pemeriksaan Angka Kapang Khamir (AKK) merupakan salah satu uji yang dilakukan untuk melihat kualitas bahan pangan dari aspek mikrobiologi. Pada pengujian uji AKK dilakukan pada sampel jamu kunyit yang dijual di kawasan Denpasar Selatan. Pengujian

AKK pada penelitian ini dimulai dengan melakukan inokulasi sampel jamu kunyit pada media SDA menggunakan metode sebar dan kemudian dihitung koloninya dengan menggunakan metode hitung cawan. Hasil pengujian yang disajikan pada Tabel 3 menunjukkan bahwa 35% sampel jamu kunyit memiliki nilai AKK melebihi standar sehingga sampel jamu kunyit tersebut tidak layak untuk dikonsumsi. Sebanyak 65% sampel jamu kunyit memiliki nilai AKK yang berada dalam rentang normal dan memenuhi standar. Pada penelitian ini standar yang digunakan adalah ketentuan yang ditetapkan oleh BPOM RI Nomor 12 Tahun 2014 bahwa cairan obat tradisional tidak boleh mengandung AKK lebih dari 10^3 koloni/mL. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa nilai AKK tertinggi adalah sebanyak $184,1 \times 10^3$ koloni/mL dan nilai AKK terendah adalah <10 koloni/mL. Hasil penelitian sejalan dengan penelitian dari 66,7% jamu yang diuji menunjukkan nilai yang melebihi nilai standar yang ditetapkan oleh BPOM RI Nomor 12 Tahun 2014. Hasil pada sampel jamu kunyit yang diuji terdapat satu sampel yang menunjukkan nilai yang melebihi standar yaitu $4,6 \times 10^3$ koloni/mL, sehingga jamu tersebut tidak layak untuk dikonsumsi⁵.

Berdasarkan hasil observasi yang dilakukan bahwa terdapat beberapa karakteristik jamu kunyit yang dapat mempengaruhi adanya pertumbuhan kapang dan khamir yaitu kemasan jamu kunyit, lama pemakaian kemasan, jenis produksi jamu kunyit dan penyimpanan jamu kunyit. Berdasarkan karakteristik kemasan jamu kunyit dan lama pemakaian kemasan, didapatkan hasil bahwa koloni yang paling banyak tumbuh adalah pada sampel kemasan jamu kunyit dengan label yaitu sebanyak 8 sampel jamu kunyit (35%) dan kemasan jamu kunyit tanpa label memiliki nilai AKK yang masih dalam rentang normal dengan jumlah 15 sampel jamu kunyit (65%). Tingginya nilai AKK pada jamu kunyit kemasan berlabel disebabkan oleh penggunaan kemasan yang kurang bersih karena tidak melalui proses sterilisasi terlebih dahulu dan kondisi kemasan yang tidak kering sehingga menyebabkan pertumbuhan kapang dan khamir. Selain itu, berdasarkan hasil observasi diketahui bahwa jamu kunyit yang disimpan dalam kemasan berlabel biasanya akan disimpan kembali selama lebih dari 1 hari pada suhu ruang sehingga memberikan waktu bagi spora fungi untuk tumbuh pada jamu, sedangkan pada jamu kunyit dengan kemasan yang

tidak berlabel akan habis terjual setiap harinya sehingga tidak melewati proses penyimpanan.

¹⁸ Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan diketahui bahwa kapang dan khamir tumbuh optimal pada penyimpanan ¹⁹ hari ke-3 sampai hari ke-5 pada suhu ruang. Hasil penelitian yang dilakukan pada sampel roti tawar dengan penyimpanan pada suhu kamar 25°C, bahwa pada penyimpanan hari ke-4, jumlah kapang yaitu $8,4 \times 10^4$ koloni/gram, pada penyimpanan hari ke-5 jumlah kapang yaitu $9,5 \times 10^4$ koloni/gram dan selanjutnya pada penyimpanan hari ke-6 jumlah kapang yaitu $13,3 \times 10^4$ koloni/gram. Jumlah kapang pada penyimpanan suhu kamar 25°C setiap harinya terjadi peningkatan⁷. Penelitian yang dilakukan pada sampel sirup temulawak yang disimpan selama 4 minggu pada suhu 35°C, didapatkan hasil bahwa semakin lama penyimpanan maka jumlah mikroorganisme pada sampel sirup makin meningkat, dimana diketahui pada awal pemeriksaan didapatkan hasil $2,6 \times 10^1$ koloni/mL dan pada minggu keempat didapatkan hasil $7,6 \times 10^2$ koloni/mL⁸. Jenis produksi jamu kunyit di Denpasar Selatan terdiri dari dua jenis yaitu dibuat sendiri oleh penjual jamu dan dibuat oleh industri rumah tangga. Dari kedua jenis produksi jamu

tersebut, didapatkan pertumbuhan koloni kapang dan khamir pada sampel jamu kunyit. Hal ini disebabkan oleh proses pembuatan jamu kunyit yang tidak sesuai dengan CPOTB, sehingga dapat menimbulkan pertumbuhan fungi pada jamu kunyit. menurut Pencucian yang bersih terhadap bahan baku jamu kunyit yaitu rimpang kunyit, dapat meminimalkan pertumbuhan kapang dan khamir pada jamu⁹. Selain itu, pemanasan juga sangat berperan penting dalam pembuatan jamu, dimana pemanasan dilakukan untuk mematikan spora kapang dan khamir¹⁰. Dari hasil penelitian yang dilakukan terhadap 23 sampel jamu kunyit yang dijual di wilayah Denpasar Selatan terdapat 35% jamu kunyit yang tidak memenuhi standar karena memiliki nilai AKK yang melebihi standar, sehingga jamu tersebut tidak layak untuk dikonsumsi.

2. Identifikasi *Aspergillus sp.*

Identifikasi *Aspergillus sp.* digunakan untuk mengetahui ada tidaknya *Aspergillus sp.* pada sampel jamu kunyit. *Aspergillus sp.* dapat mengeluarkan aflatoxin yang dapat bersifat toksik bagi manusia apabila masuk kedalam tubuh. Berdasarkan hasil ²² yang disajikan pada Tabel 4 diketahui bahwa terdapat 2 sampel jamu kunyit mengandung koloni kapang yaitu

Aspergillus sp. dapat dikatakan bahwa sampel tersebut kualitasnya menurun karena adanya pertumbuhan *Aspergillus sp.* dengan jenis *Aspergillus niger*. Hasil penelitian serupa yang dilakukan pada empat sampel jamu ditemukan positif *Aspergillus sp.* dan jenis kapang yang paling banyak ditemukan dari keempat sampel jamu tersebut adalah *Aspergillus niger* dan *Aspergillus flavus*⁶. Pertumbuhan *Aspergillus sp.* pada jamu kunyit dapat disebabkan oleh adanya kontaminasi dari lingkungan yaitu udara. Pada saat pedagang jamu menuangkan jamu kunyit kedalam botol tidak mementingkan lokasi penuangan jamu. Hasil penelitian menyebutkan kontaminasi jamur *Aspergillus sp.* dapat melalui udara yang mengandung *Aspergillus sp.* Spora *Aspergillus sp.* berukuran kecil yaitu 3,0-4,5 mm dan dapat terbang dengan mudah bercampur dengan udara, sehingga apabila proses pembuatan jamu kunyit dan tempat penjualan yang tidak bersih, maka jamu kunyit yang dibuat akan terkontaminasi oleh *Aspergillus sp.*¹¹. Selain itu, kontaminasi oleh spora *Aspergillus sp.* yang terjadi di luar ruangan dapat disebabkan oleh organisme yang membusuk dan adanya asap kendaraan bermotor¹².

Identifikasi *Aspergillus sp.*, pada penelitian ini dilakukan dengan 2 metode, yaitu secara makroskopis dan mikroskopis. Dari 23 sampel jamu kunyit, terdapat 2 sampel jamu kunyit yang ditumbuhi koloni *Aspergillus sp.* yaitu sampel 10 dan sampel 22. Pada pengamatan makroskopis pada sampel 10 yang disajikan pada Gambar 6, didapatkan koloni *Aspergillus sp.* dengan ciri-ciri koloni tunggal, berwarna kuning kehitaman, bentuk koloni bulat, tekstur seperti beludru. Sedangkan pada sampel 22 yang disajikan pada Gambar 7 didapatkan koloni *Aspergillus sp.* dengan ciri-ciri koloni tunggal, berwarna hitam, bentuk koloni bulat, tekstur berserabut seperti beludru.

Pada pengamatan secara mikroskopis dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 40x, ditemukan bahwa pada kedua sampel jamu kunyit mengandung *Aspergillus niger*. Hal tersebut sesuai dengan ciri-ciri koloni *Aspergillus sp.* Pada pembuatan biakan murni *Aspergillus niger* pada media PDA, yaitu tampak koloni berbentuk bulat, tekstur lembut, tepi koloni rata, serta berwarna hitam dan coklat kehitaman. Koloni *Aspergillus sp.* yang didapatkan pada media SDA yang digunakan dalam penelitian ini tidak ada perbedaan dengan koloni *Aspergillus sp.*

yang ditumbuhkan pada media PDA tersebut. Hal ini dikarenakan kedua media memang diperuntukkan untuk pertumbuhan jamur. Kedua media mengandung karbohidrat, pepton dan dektrose yang cukup tinggi sehingga mampu memenuhi kebutuhan nutrisi yang akan digunakan untuk pertumbuhan jamur¹². Pada pengamatan morfologi secara mikroskopis terlihat jamur *Aspergillus niger* mempunyai hifa hialin dan struktur hifa memanjang tidak bercabang, konidiofor bersekat, konidia bulat dan berwarna coklat kehitaman. Dari hasil penelitian yang dilakukan terhadap 23 sampel jamu kunyit yang dijual di Denpasar Selatan terdapat pertumbuhan *Aspergillus sp.* pada 2 sampel jamu kunyit sehingga kedua jamu tersebut tidak layak untuk dikonsumsi¹³.

¹² SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik simpulan sebagai berikut:

1. Jumlah Angka Kapang Khamir yang ada pada jamu kunyit yang dijual di kawasan Denpasar Selatan ditemukan AKK tertinggi yaitu $184,1 \times 10^3$ koloni/mL dan nilai AKK terendah <10 koloni/mL
2. Nilai Angka Kapang Khamir pada jamu kunyit memenuhi syarat 8 sampel jamu kunyit, dan yang tidak memenuhi syarat 15 sampel jamu kunyit, berdasarkan standar kualitas BPOM RI Nomor 12 Tahun 2014 tentang obat tradisional.
3. Hasil identifikasi *Aspergillus sp.* yang ada pada jamu kunyit yang dijual di kawasan Denpasar Selatan ditemukan positif *Aspergillus sp.* sebanyak 2 sampel jamu kunyit (9%) dan 21 sampel negatif *Aspergillus sp.* (91%), serta jenis yang ditemukan adalah *Aspergillus niger*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Selatan KD. Rencana Strategis (Renstra). 2016; Available from: [https://denpasarkota.go.id/assets_subdomain/49/download/Rencana Strategis \(RENSTRA\) Kecamatan Denpasar Selatan_000126.pdf](https://denpasarkota.go.id/assets_subdomain/49/download/Rencana_Strategis_(RENSTRA)_Kecamatan_Denpasar_Selatan_000126.pdf)
 2. Putra WS. Kitab Herbal Nusantara : Aneka Resep dan Ramuan Obat untuk Berbagai Gangguan Kesehatan. 1st ed. Yogyakarta; 2015. 177-180 p.
 3. Thearesti CC. Uji Angka Kapang/Khamir (AKK) Identifikasi *E.coli* dalam jamu kunyit asam dari penjual jamu di wilayah Ngawen Klaten. 2015; Available from: https://repository.usd.ac.id/2724/2/128114072_full.pdf
- Meditory** | ISSN Online : 2549-1520, ISSN Cetak : 2338 – 1159, Vol. 7, No. 1, Juni 2019
Hlm. 17 – 26, <http://ejournal.poltekkes-denpasar.ac.id/index.php/M>

4. Kepala P, Pengawas B, Dan O, Indonesia R, Cara T, Sarana P, et al. Badan pengawas obat dan makanan republik indonesia. 2012;1–28.
5. Retno DN. Uji Cemarkan Kapang, Khamir dan Bakteri *Staphylococcus aureus* pada Jamu Gendong di Pasar Gedhe Surakarta. 2016; Available from: <https://digilib.uns.ac.id/dokumen/detail/55109/Uji-Cemarkan-Kapang-Khamir-dan-Bakteri-Staphylococcus-aureus-pada-Jamu-Gendong-di-Pasar-Gedhe-Surakarta>
6. Sukmawati PA, Praborini MW, Kawuri R. Identifikasi Fungi Dan Total Bakteri Pada Jamu Tradisional Di Pasar Kedonganan Kelurahan Jimbaran Kabupaten Badung Provinsi Bali. *J Biol Univ Udayana* [Internet]. 2012;15(2):31–5. Available from: <https://ojs.unud.ac.id/index.php/BIO/article/view/12100>
7. Babay L. Pengaruh Suhu Dan Lama Penyimpanan Terhadap Jumlah Kapang Pada Roti Tawar. *J Kesehat Masy*. 2013;1–9.
8. Suwita IK, Kristian Y, Purwaningsih FY. Pendugaan Umur Simpan Sirup Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) Madu dan Ekstrak Ikan Gabus (*Ophiocephalus striatus*) dengan Model Arrhenius dan Model Q10. *J Ilm Fak Pertan Univ Yudharta Pasuruan*. 2012;2(1):18–35.
9. Prasetyo, Inorah E. Pengelolaan Budidaya Tanaman Obat-Obatan. 2013. p. 155.
10. Aminah NS, Supraptini. Pengamatan Jenis-Jenis Jamur yang Ditemukan Pada Minuman Susu Segar dan Susu Kemasan. *J Media Litbang Kesehat*. 2005;XV.
11. Ariana D. IDENTIFIKASI SPESIES JAMUR PADA RUMAH MAKAN DI KAWASAN STASIUN GUBENG SURABAYA. *J Muhammadiyah Med Lab Technol*. 2011;2(2).
12. Wulandari DE, Asrul, Lakani I. *Phytophthora palmivora* Selection of *Aspergillus niger* Fungal Antagonist from Several Cacao Plantations to Controlling *Phytophthora palmivora*. *J Agrol*. 2016;23(3):233–42.
13. Aurisia PP, Proborini MW, Nuhantoro I. Pengaruh Media Terhadap Pertumbuhan dan Biomassa Cendawan *Alternaria alternata* (Fries) Keissler. *J Biol*. 2000;19(1):30–3.

UJI ANGKA KAPANG KHAMIR DAN IDENTIFIKASI *Aspergillus* species PADA JAMU KUNYIT DI DENPASAR SELATAN

ORIGINALITY REPORT

8%

SIMILARITY INDEX

7%

INTERNET SOURCES

1%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	jitek.ub.ac.id Internet Source	<1 %
2	www.neliti.com Internet Source	<1 %
3	jim.unsyiah.ac.id Internet Source	<1 %
4	A R Wali, Nursyirwani, M Verawaty, Saryono. " Antimicrobial Production Using Endophytic Fungus . LBKURCC43 by Carbon and Nitrogen Modification ", Journal of Physics: Conference Series, 2019 Publication	<1 %
5	ejournal.unipas.ac.id Internet Source	<1 %
6	jurnal.umsu.ac.id Internet Source	<1 %
7	media.neliti.com Internet Source	<1 %

8	digilib.uin-suka.ac.id Internet Source	<1 %
9	docshare.tips Internet Source	<1 %
10	jurnal.ugm.ac.id Internet Source	<1 %
11	jurnal.untan.ac.id Internet Source	<1 %
12	ktikebidanancom.wordpress.com Internet Source	<1 %
13	ejournal.almaata.ac.id Internet Source	<1 %
14	ejurnal.its.ac.id Internet Source	<1 %
15	materifarmasismk.blogspot.com Internet Source	<1 %
16	publikasi.dinus.ac.id Internet Source	<1 %
17	Siti Fatimah, Muji Rahayu, Andra Lois T. Rinding. "Analisis Sakarin dalam Jamu Kunyit Asam yang Dijual di Malioboro dan di Pasar Beringharjo Yogyakarta", Biomedika, 2017 Publication	<1 %
18	alvinzidniya.blogspot.com Internet Source	<1 %

19	beranisehat.com Internet Source	<1 %
20	digilib.poltekkesdepkes-sby.ac.id Internet Source	<1 %
21	digilib.unisayogya.ac.id Internet Source	<1 %
22	journal.uny.ac.id Internet Source	<1 %
23	journal.walisongo.ac.id Internet Source	<1 %
24	repository.poltekkes-tjk.ac.id Internet Source	<1 %
25	repository.stikes-bhm.ac.id Internet Source	<1 %
26	vdocuments.mx Internet Source	<1 %
27	www.semanticscholar.org Internet Source	<1 %
28	www.slideshare.net Internet Source	<1 %

Exclude quotes On
Exclude bibliography On

Exclude matches Off

PENGARUH PENUNDAAN PEMERIKSAAN URIN TERHADAP JUMLAH LEUKOSIT PADA PENDERITA INFEKSI SALURAN KEMIH

by B 7

Submission date: 15-May-2021 06:32AM (UTC+0700)

Submission ID: 1586356938

File name: Meditory_1_2019.pdf (258.89K)

Word count: 1613

Character count: 9641

PENGARUH PENUNDAAN PEMERIKSAAN URIN TERHADAP JUMLAH LEUKOSIT PADA PENDERITA INFEKSI SALURAN KEMIH

Bunga Dewanti¹, I Gusti Agung Dewi Sarihati², Burhannuddin³

1,2,3 Jurusan Analis Kesehatan Denpasar

Email : dewisarihati@gmail.com

Abstract:

Background : urine is the rest of the body's metabolism that is released through the process of urinalization. Urine examination aims to determine the condition of the kidney and other urinary tracts. Delays in examination⁶ in the laboratory often occur resulting in disturbed urine stability.

Purpose : this study aims to determine the effect of delays on the number of urine leukocytes in patients with urinary tract infections.

Method : this research with posttest only control group design using four control and treatment groups each consisting of 9 samples. The control group is the result of urine examination which is examined before 30 minutes while the treatment group is the result of urine examination after 1, 2 and 3 hours since being collected.

Result : the results showed an average difference between the control and treatment groups, especially there was a significant reduction in the 3-hour delay group.

Conclusion : the delay in urinary examination for 3 hours affects the amount of urine leukocytes in patients with urinary tract infections

Keywords: urine leukocytes, delay in urine examination

PENDAHULUAN

Infeksi saluran kemih (ISK) merupakan infeksi yang paling umum terjadi di komunitas masyarakat bahkan di rumah sakit. Kasus ISK tertinggi terjadi pada anak-anak terutama pada perempuan karena pendeknya saluran kemih atau uretra dan lebih dekat dengan anus¹, hanya 8% penderita menunjukkan gejala adanya infeksi saluran kemih. Biasanya pada urine pasien dengan infeksi saluran kemih akan ditemukan leukosit dalam jumlah rendah hingga tinggi tergantung pada seberapa besar

luka yang menyebabkan infeksi di dalam saluran kemih.²

Urinalisa merupakan salah satu pemeriksaan yang berfungsi untuk memantau kondisi ginjal dan saluran kemih. Parameter yang paling diperhatikan pada pemeriksaan urinalisa metode uji carik celup berupa bakteri, leukosit, eritrosit, nitrit, dan protein. Parameter tersebut dianggap mampu menggambarkan kondisi ginjal dan saluran kemih.³ Untuk mendapat hasil yang baik maka variasi fase dalam preanalitik harus diidentifikasi dengan

benar seperti tes yang diperlukan, pengumpulan (sampling), transportasi sampel untuk sampai ke laboratorium, penerimaan sampel yang datang, hingga bagaimana cara menyiapkan sampel di tahap pengujian karena bila tidak dilakukan dengan baik dapat menjadi sumber kesalahan yang sangat fatal.⁴ Tahapan pre-analitik yang tidak tepat mampu menurunkan angka hasil palsu menjadi hampir 20% dari suatu hasil pemeriksaan laboratorium sehingga menyebabkan kesalahan diagnosa.⁴ Menurut pengamatan langsung dari peneliti di laboratorium Rumah Sakit, urine tidak langsung diperiksa hanya didiamkan pada suhu ruang sekitar 1 sampai 1,5 jam setelah penampungan ke dalam wadahnya yang diakibatkan oleh banyaknya jumlah pasien atau tertundanya pengiriman sampel dari ruangan ke laboratorium. Bahkan ketika pasien sedang tidak banyak, urine dibiarkan hingga menumpuk dan ditunda selama hampir 2 jam. Dari permasalahan di atas, penulis tertarik untuk melakukan penelitian terkait pengaruh penundaan urine terhadap jumlah leukosit.

METODE

Penelitian

5 menggunakan

rancangan *Posttest Only Control Group*

Design. Sampel diambil dari 9 orang pasien infeksi saluran kemih yang diperiksa di laboratorium BRSU Tabanan. Urin dibagi kedalam empat kelompok, kelompok pertama adalah kelompok kontrol yaitu pemeriksaan yang dilakukan sebelum 30 menit sedangkan tiga kelompok lainnya diberikan perlakuan berupa penundaan pemeriksaan selama 1, 2 dan 3 jam. Metode pemeriksaan leukosit urine dilakukan secara mikroskopis dengan menggunakan preparat basah Hasil pemeriksaan urin keempat kelompok diuji dengan *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney U*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rata-rata tertinggi jumlah leukosit ditemukan pada kelompok kontrol sebesar 13,1 sel/LPB dengan standar deviasi 7,68 dan terendah pada penundaan 3 jam sebesar 7,2 sel/LPB dengan standar deviasi 5,93.

Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan ada pengaruh penundaan terhadap jumlah leukosit pada pasien infeksi saluran kemih dengan nilai p sebesar 0,034. Pengaruh tersebut terjadi antara kelompok kontrol dengan penundaan pemeriksaan 3 jam dengan nilai p sebesar

0,021 pada uji *Mann-Whitney U*. Perbedaan rata-rata kelompok kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada tabel 1 dan tabel 2.

Tabel 1. Perbedaan Rata-rata Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji *Kruskal-Wallis*

Perlakuan	Rata-rata	Standar Deviasi	Uji <i>Kruskal-Wallis</i> (p)
Kontrol	13,1	7,68	0,034
1 Jam	11,1	7,06	
2 Jam	9,1	6,77	
3 Jam	7,2	5,93	

Tabel 2. Hasil Uji *Mann-Whitney U* Perbedaan Rata-rata Kelompok Kontrol dengan Perlakuan

Perlakuan	Uji <i>Mann-Whitney U</i> (p)
Kontrol dengan penundaan 1 jam	0,181
Kontrol dengan penundaan 2 jam	0,051
Kontrol dengan penundaan 3 jam	0,021

Keterangan : Kontrol merupakan hasil pemeriksaan leukosit urine sebelum 30 menit

Infeksi saluran kemih (ISK) sering ditemukan pada wanita maupun pria dengan gejala klinis yang berbeda-

beda.⁵ Penegakan diagnosa infeksi saluran kemih secara laboratorium dapat dilihat pada parameter-parameter urinalisa, salah satunya adalah leukosit. Pemeriksaan alternatif untuk mengetahui kondisi dari leukosit dapat dilakukan dengan uji carik celup atau dipstik. Namun, tidak menutup kemungkinan untuk memperhatikan parameter pemeriksaan urine lainnya. Dalam uji dipstik, leukosit dapat dideteksi pada parameter leukosit carik celup melalui adanya reaksi antara reagen dengan enzim leukosit esterase yang terkandung di dalam sel netrofil.⁶

Delanghe dan Speeckaert menjelaskan bahwa tahapan preanalitik yang tidak tepat dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan urine. Hal ini dikarenakan sampel yang akan diperiksa diperlakukan tidak baik sehingga menyebabkan perubahan kadar analit di dalamnya. *Human error* atau kondisi lingkungan sekitar laboratorium dapat menjadi faktor penyebab ketidaktepatan preanalitik. Salah satunya adalah penundaan pemeriksaan terhadap sampel laboratorium yang sering terjadi di

fasilitas pelayanan kesehatan seperti rumah sakit.⁴

Hasil penelitian yang sejalan yang memperlihatkan bahwa terjadi penurunan jumlah leukosit urin akibat penyimpanan urin pernah diteliti oleh Kustiningsih, Cahyono, dan Rahmiati pada penderita Diabetes Melitus.⁷ Penurunan jumlah leukosit dapat terjadi akibat faktor suhu, suhu yang lebih tinggi akan menyebabkan pertumbuhan bakteri yang semakin cepat sehingga enzim dalam urine semakin cepat mengalami katalisasi. Hal ini mampu merusak sel leukosit dalam urine. Selain dari itu, penundaan dalam pemeriksaan urine pada pasien infeksi saluran kemih dapat menyebabkan pembelahan bakteri semakin cepat dan mempercepat potensi bakteri untuk mengubah urea menjadi ammonia dalam urine. Ammonia akan mengakibatkan pH dalam urine akan bergeser ke arah basa dan berpotensi melisiskan leukosit dalam urine.⁸

Pemeriksaan harus dilakukan secepat mungkin, paling lambat 1 jam setelah urin ditampung. Melakukan penundaan pemeriksaan dapat menjadi sumber kesalahan, sehingga hasil yang

diharapkan tidak sesuai dengan kondisi klinis pasien. Unsur-unsur berbentuk (sedimen) dalam urin mulai rusak dalam waktu 2 jam dan bila dibiarkan lama dalam suhu kamar akan terjadi lisis sel serta torak dan urin akan berubah menjadi alkalis.⁹

Berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Naid, Mangerangi, dan Almahdaly, menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh penundaan terhadap jumlah leukosit. Penundaan urine selama 2 jam dapat menyebabkan ketidakstabilan urine sehingga terjadi pergeseran pH urine menjadi lebih asam atau basa tergantung kondisi pasien. Hal ini akan mempengaruhi status kimiawi urine seperti keton, urobilinogen, nitrit, dan glukosa. Sedangkan unsur sedimen urine seperti leukosit dan epitel mengalami perubahan berupa negatif palsu apabila disimpan selama hampir 2 jam.¹⁰

KESIMPULAN

Ada pengaruh penundaan pemeriksaan urine terhadap jumlah leukosit urine pada pasien infeksi saluran kemih bila dilakukan penundaan 3 jam.

Daftar Pustaka

1. Najeeb, S., Munir, T., Rehman, S., Hafiz, A., Gilani, M. and Latif, M. Comparison of Urine Dipstick Test with Conventional Urine Culture in Diagnosis of Urinary Tract Infection'. *J. Coll. Physicians Surg. Pakistan* Vol. 25 (2), 108–110 (2015).
2. Robinson, J. L., Finlay, J. C., Wang, M. E. & Bortolussi, R. Urinary tract infection in infants and children: Diagnosis and management. *INFECTIOUS DISEASES AND IMMUNIZATION COMMITTEE* 19, (2014).
3. Utsch, B. & Klaus, G. Urinalysis in Children and Adolescents. *Dtsch. Arzteblatt Online* (2014). doi:10.3238/arztebl.2014.0617
4. Delanghe, J. & Speeckaert, M. Preanalytical requirements of urinalysis. *Biochemia Medica* (2014). doi:10.11613/BM.2014.011
5. Seputra, K. P. et al. *Guideline Penatalaksanaan Infeksi Saluran Kemih dan Genitalia Pria 2015*. (2015).
6. Triasta, Setiabudi, D. dan Rahmadi, D. Faktor Risiko Kecurigaan Infeksi Saluran Kemih pada Anak Laki-Laki Usia Sekolah Dasar'. *Sari Pediatr.* 18(2), 137–41 (2016).
7. Kustiningsih, Y., Cahyono, J. A. and Rahmiati, N. Pengaruh Lama Penyimpanan Urine Pada Suhu Kamar Terhadap Jumlah Leukosit Studi Pada Penderita Diabetes Mellitus'. (2016).
8. Gandasoebrata, R. *Penuntun Laboratorium Klinik*. (Dian Rakyat, 2013).

9. Widman, F. K. *Tinjauan Klinis atas Hasil Pemeriksaan Laboratorium*. (Penerbit Buku Kedokteran. EGC, 1995).
10. Naid, T., Mangerangi, F. & Almahdaly, H. Pengaruh Penundaan Waktu terhadap Hasil Urinalisis Sedimen Urin. **06**, 212–219 (2014).

PENGARUH PENUNDAAN PEMERIKSAAN URIN TERHADAP JUMLAH LEUKOSIT PADA PENDERITA INFEKSI SALURAN KEMIH

ORIGINALITY REPORT

4%

SIMILARITY INDEX

3%

INTERNET SOURCES

2%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

- | | | |
|---|--|------|
| 1 | Diyah Candra Anita, dkk. "TINGKAT NYERI PEMASANGAN KATETER MENGGUNAKAN JELI OLES DAN JELI YANG DIMASUKKAN URETHRA", Jurnal Kebidanan dan Keperawatan Aisyiyah, 2016
Publication | <1 % |
| 2 | Reifanli M. Pai, Adrian . Umboh, Rocky . Wilar. "Hubungan kebiasaan mandi di sungai dengan kejadian leukosituria pada anak di Kelurahan Karama", e-CliniC, 2016
Publication | <1 % |
| 3 | digilib.unimed.ac.id
Internet Source | <1 % |
| 4 | ilmiahtesis.wordpress.com
Internet Source | <1 % |
| 5 | journal.um-surabaya.ac.id
Internet Source | <1 % |
| 6 | www.repository.trisakti.ac.id
Internet Source | <1 % |

7

Boris Utsch, Günter Klaus. "Urinalysis in Children and Adolescents", Deutsches Aerzteblatt Online, 2014

Publication

<1 %

8

res.mdpi.com

Internet Source

<1 %

9

repozitorij.unizg.hr

Internet Source

<1 %

Exclude quotes On

Exclude matches Off

Exclude bibliography On

IDENTIFIKASI DAN UJI SENSITIVITAS BAKTERI *Neisseria* *gonorrhoeae* TERHADAP ANTIBIOTIK SEFIKSIM PADA PEKERJA SEKS KOMERSIAL DI PUSKESMAS II DENPASAR SELATAN

by Burhannuddin Burhannuddin

Submission date: 23-Aug-2021 09:37AM (UTC+0700)

Submission ID: 1634563837

File name: Jurnal_Meditory_Vol_9_No_1_2021.pdf (263.58K)

Word count: 3744

Character count: 24249

IDENTIFIKASI DAN UJI SENSITIVITAS BAKTERI *Neisseria gonorrhoeae* TERHADAP ANTIBIOTIK SEFIKSIM PADA PEKERJA SEKS KOMERSIAL DI PUSKESMAS II DENPASAR SELATAN

Ardhia Pradnyadhita, Burhannuddin*, I Wayan Merta, Nur Habibah

Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar

Jalan Sanitasi No.1 Sidakarya Denpasar Selatan

*corresponding author, e-mail: boerhannuddin@gmail.com

Abstract

Background: Gonorrhea is a sexually transmitted disease caused by *Neisseria gonorrhoeae*. Gonorrhea infection varies greatly in the community, especially in sexually active women. Infection cases in women are often asymptomatic, that can causes complication can easily occur. **Aims:** to identify and determine sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae* bacteria against cefixime antibiotics. **Method:** This study was using a descriptive method and used 30 samples. *Neisseria gonorrhoeae* was isolated from the vaginal swab sample of Commercial Sex Workers at Puskesmas II Denpasar Selatan. The cultured bacteria on Thayer Martin media were then identified by gram staining, oxidase test, and catalase test. *Neisseria gonorrhoeae* sensitivity test against cefixime was performed by disc diffusion method. **Result:** The results of identification showed that 6 (20 %) of 30 samples were *Neisseria gonorrhoeae* bacteria with cell characteristics in the form of diplococcus, gram-negative, oxidase and catalase positive. The results of the sensitivity test showed that all isolats of *Neisseria gonorrhoeae* were resistant to cefixime. **Conclusion:** Cefixime is not effective for treating *Neisseria gonorrhoeae* infection

Keywords: Commercial Sex Workers, *Neisseria gonorrhoeae*, Identification, Susceptibility test

PENDAHULUAN

Prevalensi Infeksi Menular Seksual (IMS) yang terjadi di Denpasar Selatan pada bulan Januari – Juni 2012 tercatat sebanyak 601, kasus infeksi yang paling sering terjadi adalah servitis dengan jumlah 200 kasus (33,3%), diikuti oleh gonore sebanyak 14 kasus (2,3%), serta sifilis dan urethritis masing-masing sebanyak 10 kasus (1,7%). Populasi infeksi terbanyak terjadi pada kelompok usia 25 hingga 49 tahun sebanyak 423 kasus (70,4%), dimana pasien perempuan

sebanyak 561 kasus (93,3%) ditemukan lebih banyak daripada pasien laki-laki sejumlah 40 kasus (6,7%). Didapati pula faktor resiko terbanyak pada wanita pekerja seksual sebanyak 379 kasus (63%)¹.

Infeksi gonore sangat bervariasi di masyarakat, ditemukan banyak pada wanita yang aktif secara seksual seperti pada Pekerja Seks Komersil (PSK)². PSK merupakan suatu profesi yang sangat rentan mendapatkan infeksi gonore karena kegiatan seksual yang dilakukan oleh PSK sering kali berganti-ganti

pasangan. PSK beresiko melakukan hubungan seksual yang tidak aman dan menyebabkan kasus gonore yang sangat sulit untuk ditangani³. Pada kelompok ini sangat disarankan untuk melakukan skrining terhadap infeksi gonore karena seringkali tidak menunjukkan suatu gejala (asimtomatik) sehingga komplikasi dapat dengan mudah terjadi⁴. Jika infeksi *Neisseria gonorrhoeae* tidak segera diobati dan tidak ditangani dengan tepat maka dapat menyebabkan peradangan pada saluran genital dan reproduksi sehingga dapat menyebabkan ketidaksuburan⁵.

Salah satu pengobatan terhadap infeksi *Neisseria gonorrhoeae* adalah dengan terapi antibiotik. Antibiotik adalah agen antimikroba alami yang diproduksi oleh mikroorganisme⁶. Pengobatan yang dianjurkan oleh Departemen Kesehatan Republik Indonesia untuk infeksi gonore tanpa komplikasi adalah sefiksim atau levofloksasin, sedangkan pilihan lainnya adalah kanamisin, seftriakson, atau tiamfenikol⁷. Sefiksim adalah antibiotik sefalosporin generasi ketiga yang dikonsumsi secara oral, yang memiliki aktivitas spektrum luas terhadap bakteri Gram positif, Gram negatif dan tahan terhadap degradasi beta-laktamase. Dosis yang direkomendasikan untuk pengobatan infeksi mikroorganisme adalah dibawah 90%. Resistensi terhadap beberapa antibiotik banyak ditemukan dalam beberapa tahun terakhir.

Sefalosporin generasi ketiga seperti sefiksim atau seftriakson merupakan pilihan terapi lini pertama di berbagai negara, namun penurunan kepekaan sefiksim sudah didapatkan dan mulai menyebar⁸.

Uji sensitivitas antibiotik akan membantu dokter untuk menentukan antibiotik yang tepat dalam mengobati infeksi⁹. Metode untuk tes suseptibilitas ini dapat dikerjakan dengan berbagai teknik. Metode yang sering digunakan adalah menggunakan difusi cakram dan dilusi agar menurut kriteria Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) yang pertama kali dijabarkan oleh Bauer dkk dan merupakan modifikasi dari National Commitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)¹⁰. Beberapa data hasil penelitian terhadap uji sensitivitas kuman *Neisseria gonorrhoeae* terhadap beberapa antibiotik adalah sebagai berikut: amoxicillin (83%), ciprofloxacin (67%), kanamycin (67%)⁴, seftriaxon (51.2%) dan sefiksim (62.1%)¹¹.

Permasalahan resistensi bakteri terhadap antibiotik merupakan masalah yang terjadi diseluruh dunia. Salah satu cara yang dapat mencegah terjadinya resistensi antibiotik adalah penggunaan antibiotik secara rasional yang meliputi pengobatan yang sesuai dengan kebutuhan klinisnya, pemberian dosis yang sesuai dengan kebutuhannya dalam kurun waktu yang adekuat¹². Hal ini dapat menyebabkan angka kesembuhan menurun, pengobatan yang tidak tuntas, angka

Pradnyadhita, A., dkk.,: ¹ Identifikasi dan Uji Sensitivitas Bakteri *Neisseria Gonorrhoeae* Terhadap Antibiotik Sefiksim Pada Pekerja Seks Komersial di Puskesmas II Denpasar Selatan

³ kekambuhan yang semakin meningkat dan angka penularan yang semakin tinggi¹¹.

Berdasarkan uraian diatas dan mengingat angka kejadian infeksi gonore yang meningkat maka perlu dilakukan ¹ identifikasi dan uji sensitivitas bakteri *Neisseria gonorrhoeae* terhadap antibiotik sefiksim. Penelitian ini dilakukan pada Pekerja Seks Komersial yang berisiko tinggi terinfeksi bakteri dan menularkannya pada orang lain. Penelitian tentang sensitivitas *Neisseria gonorrhoeae* terhadap antibiotik sefiksim masih sedikit dilakukan sehingga penelitian ini diharapkan dapat menambah rujukan tentang pola sensitivitas *Neisseria gonorrhoeae* sehingga dapat membantu dalam pemilihan obat yang sesuai untuk terapi ¹ *Neisseria gonorrhoeae* terhadap antibiotik.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian adalah deskriptif. Pengambilan sampel dilakukan di Puskesmas II Denpasar ² Selatan. Identifikasi dan uji sensitivitas di ² Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes ⁴⁶ Denpasar. Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh Pekerja Seks Komersial yang melakukan pemeriksaan di Puskesmas II Denpasar Selatan selama ³⁹ bulan April – Juni 2018 berjumlah 66 pasien. Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik Purposive Sampling dengan kriteria yaitu: bersedia untuk diikuti dalam penelitian

² *Meditory* | ISSN Online : 2549-1520, ISSN Cetak : 2338 – 1159, Vol. 9, No. 1, Juni 2021
Hlm. 1 – 11, <http://ejournal.poltekkes-denpasar.ac.id/index.php/M>

dengan menandatangani *informed consent*, tidak sedang mengalami menstruasi, tidak sedang hamil, dan tidak sedang menjalani terapi antibiotik. Jumlah sampel yang didapatkan berdasarkan kriteria tersebut adalah 30 sampel swab vagina.

¹⁴ Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik (*Radwag*), autoklaf (*SX-500*, Tomy), inkubator (*T01892*, Esco), *Bio Safety Cabinet* (*Biobase*), mikroskop (*olympus*), api bunsen, gelas beaker (*Iwaki-Pyrex*), ⁴⁴ Erlenmeyer (*Iwaki-Pyrex*), tabung reaksi (*Iwaki-Pyrex*), rak tabung reaksi, *petridish*, *coolbox*, ose bulat disposable, objek glass, lidi kapas (*cotton swab*), rak pencucian, spektrofotometer *McFarland* (*BioSan*) dan pinset. Adapun bahan-bahan yang digunakan antara lain media *Stuart* (*Oxoid*), media GC agar (*Oxoid*) atau *Thayer Martin*, cakram Antibiotik Sefiksim (*Oxoid*), darah kambing, NaCl 0.9%, standar *McFarland*, minyak emersi, pewarna Gram, akuades, kertas label, aluminium foil, kapas berlemak, tissue, larutan hidrogen peroksida dan alkohol 70%.

Pengambilan sampel pemeriksaan dilakukan dengan teknik swab vagina. Sampel hasil swab dimasukkan ke dalam medium transport *Stuart*, kemudian diinokulasikan ¹⁹ pada media *Thayer Martin* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam ³⁰ dengan kadar CO² 5%. Koloni bakteri yang tumbuh pada media selanjutnya diidentifikasi dengan pewarnaan gram, uji katalase, dan uji

Pradnyadhita, A., dkk.,: Identifikasi dan Uji Sensitivitas Bakteri *Neisseria Gonorrhoeae* Terhadap Antibiotik Sefiksim Pada Pekerja Seks Komersial di Puskesmas II Denpasar Selatan

oksidase. Bakteri *Neisseria gonorrhoeae* yang teridentifikasi kemudian diuji sensitifitasnya terhadap sefiksim dengan metode difusi cakram atau Kirby-Bauer. Suspensi bakteri 0,5 McFarland setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml dibuat menggunakan densitometer kemudian diinokulasikan secara merata pada permukaan media GC Agar menggunakan lidi kapas steril. Cakram antibiotik sefiksim selanjutnya ditempelkan pada permukaan media yang telah diinokulasikan dengan suspensi kuman. Media diinkubasi pada inkubator pada suhu 37°C , dengan kadar CO_2 5 % selama 24 jam.

Zona hambat yang terbentuk selanjutnya diukur dan dikategorikan sensitifitasnya berdasarkan peraturan CLSI¹⁷.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Identifikasi Bakteri *Neisseria gonorrhoeae* dari Sampel Swab Vagina

Hasil kultur sampel swab vagina pada pekerja seks komersial yang melakukan pemeriksaan Infeksi Menular Seksual di Puskesmas II Denpasar Selatan selama bulan April – Juni 2018 ditunjukkan pada Tabel 1 di bawah ini :

Tabel 1. Hasil Kultur Sampel Swab Vagina pada Media *Thayer Martin*

No	Pertumbuhan	Jumlah	Presentase (%)
1	Terdapat pertumbuhan	30	100
2	Tidak terdapat pertumbuhan	0	0
	Total	30	100

Berdasarkan tabel 1 di atas dapat diketahui bahwa semua sampel swab vagina (30 sampel) yang diinokulasikan pada media Thayer Martin menunjukkan adanya

pertumbuhan bakteri. Karakteristik koloni yang tumbuh pada media *Thayer Martin* ditunjukkan pada Gambar 1 di bawah ini :



Gambar 1. Hasil inokulasi sampel swab vagina pada media Thayer Martin

Pradnyadhita, A., dkk.,: ¹⁵ ¹ Identifikasi dan Uji Sensitivitas Bakteri *Neisseria Gonorrhoeae* Terhadap Antibiotik Sefiksim Pada Pekerja Seks Komersial di Puskesmas II Denpasar Selatan

Koloni yang tumbuh pada media ¹ katalase dengan hasil ditunjukkan pada Tabel ²¹ Thayer Martin kemudian diidentifikasi dengan ² di bawah ini :
 pengecatan gram, uji oksidase, dan uji

Tabel 2. Hasil Pengecatan Gram, Uji Oksidase, dan Uji Katalase Isolat Bakteri dari Media Thayer Martin

No	Uji yang dilakukan	Hasil	Jumlah	Interpretasi
1	Pewarnaan Gram	Diplococcus Gram -	16	Diduga <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
		Coccus Gram +	14	Negatif <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
2	Uji Oksidase	Positif	13	Diduga <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
		Negatif	3	Negatif <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
3	Uji Katalase	Positif	6	Positif <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
		Negatif	7	Negatif <i>Neisseria gonorrhoeae</i>

Berdasarkan Tabel 2 di atas sebanyak 6 isolat (20 %) dari 30 isolat yang teridentifikasi merupakan bakteri *Neisseria gonorrhoeae*. *Neisseria gonorrhoeae* pada media selektif Thayer Martin, pengecatan gram, uji oksidase dan uji katalase.

Neisseria gonorrhoeae merupakan suatu bakteri patogen yang menyebabkan salah satu penyakit infeksi menular seksual yaitu gonore. Penularan penyakit ini melalui kontak seksual yang menyerang permukaan mukosa pada organ urogenital (leher rahim, uretra, dan rektum)³. Isolasi dan identifikasi *Neisseria gonorrhoeae* pada 30 sampel swab vagina pekerja seks komersial yang melakukan pemeriksaan infeksi menular seksual di Puskesmas II Denpasar Selatan meliputi berbagai macam uji di antaranya adalah kultur

Proses isolasi bakteri *Neisseria gonorrhoeae* dilakukan dengan mengkultur pada media selektif yaitu media Thayer Martin. Bakteri *Neisseria gonorrhoeae* merupakan suatu bakteri *fastidious* atau membutuhkan syarat pertumbuhan yang kompleks yaitu dengan nutrisi dan lingkungan yang khusus. Sehingga diperlukan media khusus yang dapat menyediakan kebutuhan nutrisi yang diperlukan dalam pertumbuhan bakteri ini. Salah satu media yang dapat digunakan dalam mengkultur bakteri

Neisseria gonorrhoeae adalah media Thayer Martin.

Media Thayer Martin mengandung berbagai nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri *Neisseria gonorrhoeae* yaitu harus mengandung substansi organik seperti darah yang dipanaskan, hemin dan protein hewani¹³.

Hasil kultur sampel swab vagina pada media Thayer Martin menunjukkan sebanyak 30 sampel (100 %) terdapat pertumbuhan bakteri. Karakteristik koloni bakteri yang tumbuh dapat dilihat pada Gambar 1 dengan bentuk cembung, berkilau dan nonhemolitik, yang merupakan karakteristik koloni bakteri *Neisseria gonorrhoeae*¹³. Koloni yang tumbuh pada media Thayer Martin diidentifikasi dengan pengecatan Gram untuk mengamati morfologi bakteri. Data pada Tabel 2 menunjukkan dari hasil pengecatan Gram didapatkan 16 isolat yang termasuk ke dalam bakteri gram negatif berbentuk diplococcus. Bakteri yang memiliki karakteristik gram negatif dan berbentuk diplococcus merupakan bakteri yang diduga *Neisseria gonorrhoeae*.

Bakteri *Neisseria gonorrhoeae* memiliki karakteristik mikroskopis dengan sifat Gram negatif dan berbentuk diplococcus¹³. Bakteri gram negatif akan terlihat berwarna merah saat diamati dibawah mikroskop. Hal ini berdasarkan karakteristik dinding sel bakteri gram negatif yang tersusun dari lapisan lipopolisakarida yang tidak dapat mempertahankan zat warna utama (kristal

violet) setelah pembilasan dengan alkohol, sehingga zat warna utama akan luntur dan bakteri bakteri akan menyerap zat warna safranin yang merupakan counter stain¹⁴.

Pengklasifikasian kelompok bakteri berdasarkan Gram didasari terhadap struktur sel dan respon bakteri terhadap pewarnaan gram¹³. Dari 16 isolat dengan karakteristik gram negatif berbentuk diplococcus yang merupakan bakteri terduga *Neisseria gonorrhoeae* kemudian diidentifikasi lebih lanjut dengan uji oksidase dan uji katalase.

Hasil uji oksidase pada Tabel 2 menunjukkan 13 isolat positif oksidase. Uji oksidase merupakan salah satu kunci identifikasi dari bakteri *Neisseria gonorrhoeae*. Bakteri ini memiliki enzim Cytochrome C Oxidase yang akan menimbulkan warna ungu pada strip test oksidase yang menandakan hasil positif oksidase⁴. Selain positif pada uji oksidase, *Neisseria gonorrhoeae* juga menunjukkan reaksi positif pada uji katalase. Berdasarkan Tabel 2 di atas, 6 dari 13 isolat yang diuji menghasilkan reaksi positif katalase. Bakteri *Neisseria gonorrhoeae* merupakan bakteri yang memiliki karakteristik katalase positif¹⁵.

Uji katalase merupakan uji identifikasi untuk mengidentifikasi suatu bakteri yang memiliki enzim katalase (cytochrome oxidase enzymes), hasil positif dari uji ini ditunjukkan dengan adanya gelembung udara (oksigen) yang dihasilkan setelah penambahan reagen hidrogen

Pradnyadhita, A., dkk.,: ¹ Identifikasi dan Uji Sensitivitas Bakteri *Neisseria Gonorrhoeae* Terhadap Antibiotik Sefiksim Pada Pekerja Seks Komersial di Puskesmas II Denpasar Selatan

peroksida (H_2O_2)⁴. Dari serangkaian uji identifikasi yaitu kultur pada media *Thyer Martin*, pengecatan gram, uji oksidase dan uji katalase dengan karakteristik bakteri gram negatif berbentuk diplococcus, oksidase positif dan katalase positif, dapat dilihat pada Tabel 2 bahwa dari 30 sampel swab vagina pekerja seks komersial yang diuji didapatkan 6 isolat (20 %) yang teridentifikasi sebagai bakteri *Neisseria gonorrhoeae*.

¹⁷ Beberapa faktor yang menyebabkan tingginya angka kejadian gonore adalah tingkat penularan yang tinggi, masa inkubasi yang pendek, tingkat karier asimtomatis yang tinggi, tidak adanya imunitas protektif, peningkatan resistensi antibiotik, dan perilaku seksual¹¹. Berdasarkan penelitian lain menunjukkan pekerja seks komersial memiliki

resiko tinggi terinfeksi bakteri *Neisseria gonorrhoeae*¹⁶. Selanjutnya isolat yang telah teridentifikasi sebagai *Neisseria gonorrhoeae* diuji sensitivitasnya terhadap antibiotik sefiksim

¹ Uji Sensitivitas Bakteri *Neisseria gonorrhoeae* terhadap Antibiotik Sefiksim

Hasil uji sensitivitas pada 6 isolat bakteri *Neisseria gonorrhoeae* terhadap antibiotik sefiksim ditunjukkan pada Tabel 3 di bawah ini :

Tabel 3. Diameter Zona Hambat Antibiotik Sefiksin Pertumbuhan Bakteri *Neisseria Gonorrhoeae*

No	⁵⁴ Kode Isolat	Diameter zona Hambat (mm)	Interpretasi
1	PSK 5	10 mm	Resisten
2	PSK 10	20 mm	Resisten
3	PSK 13	19,2 mm	Resisten
4	PSK 17	9,2 mm	Resisten
5	PSK 19	22,2 mm	Resisten
6	PSK 23	12,1 mm	Resisten

Ket* : Penggolongan (*sensitif* ≥ 31 mm dan *resisten* ≤ 31 mm)

⁵⁰ Berdasarkan Tabel 3 di atas diketahui bahwa dari 6 isolat bakteri *Neisseria gonorrhoeae* yang diuji sensitivitasnya terhadap sefiksim, seluruh isolat mengalami peningkatan resistensi yang ditandai dengan

ukuran zona hambat lebih kecil dibandingkan dengan standar Clinical Laboratory Standart Institute. Pemilihan antibiotik sefiksim pada penelitian ini berdasarkan dengan pilihan pengobatan yang dianjurkan oleh Kementerian Kesehatan Republik Indonesia untuk infeksi

gonore tanpa komplikasi. Sedangkan pilihan lainnya adalah kanamisin, seftriakson, atau tiamfenikol⁷. Hasil uji sensitivitas seperti yang disajikan dalam Tabel 2, diketahui bahwa sebanyak 6 isolat positif bakteri *Neisseria gonorrhoeae* dengan presentase (100 %) resisten terhadap antibiotik sefiksim. Resistensi bakteri terhadap antibiotik sefiksim ditandai dengan zona hambat yang terbentuk disekeliling cakram antibiotik yang memiliki ukuran lebih kecil dibandingkan dengan standar Clinical Laboratory Standart Institute yaitu sebesar 31 mm. Zona hambat sefiksim terhadap *Neisseria gonorrhoeae* dianggap resisten jika memiliki diameter kurang dari 31 mm¹⁷.

⁵¹ Pembacaan hasil uji sensitivitas pada penelitian ini dilakukan secara kualitatif yaitu dengan pengamatan secara visual terhadap terbentuknya zona hambat disekitar cakram antibiotik, sedangkan pengukuran secara kuantitatif dilakukan dengan melakukan pengukuran besar zona hambat disekitar cakram antibiotik dengan menggunakan jangka sorong. Seluruh isolat bakteri *Neisseria gonorrhea* yang diuji dalam penelitian ini menunjukkan resisten terhadap antibiotik sefiksim. Hasil penelitian lain menunjukkan sensitivitas *Neisseria gonorrhoeae* terhadap antibiotik sefiksim terus mengalami peningkatan yaitu sebesar 10.3 %¹⁸, 48.8 %¹¹, dan 75 %⁸. Perbedaan hasil uji sensitivitas ini disebabkan karena ³ pengobatan gonore lebih bersifat epidemiologi dibandingkan dengan individual, oleh karena itu data epidemiologi mengenai resistensi gonore terhadap antibiotik

dapat dijadikan pedoman sebagai rekomendasi pengobatan infeksi gonore¹¹.

Terjadinya peningkatan resistensi bakteri terhadap antibiotik sefiksim dapat diakibatkan oleh berbagai faktor. Faktor pendukung yang paling besar terjadinya resistensi antibiotika adalah berasal dari subjek penelitian. Penurunan suseptibilitas antibiotik dilaporkan paling banyak terjadi pada pekerja seks komersial¹¹. Hal yang mengakibatkan terjadinya penurunan sensitivitas antibiotik adalah karena pekerja seks komersial sering kali berganti-ganti pasangan seksual dan melakukan hubungan seksual yang tidak aman sehingga meningkatkan resiko terjadinya infeksi gonore³. Selain itu, bebasnya penjualan antibiotika dan penggunaan dosis obat yang tidak tepat menjadi faktor lain penyebab terjadinya resistensi antibiotika. Pekerja seks komersial terbiasa membeli dan meminum obat antibiotik tanpa resep dokter. Sehingga hal ini dapat mengakibatkan peningkatan masalah resistensi obat antibiotik terhadap infeksi bakteri khususnya pada kasus infeksi gonore¹⁸.

Selain faktor yang berasal dari subjek penelitian faktor dari mekanisme pertahanan bakteri terhadap obat juga mendukung terjadinya resistensi antibiotik. Antibiotik yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibiotik sefiksim yang merupakan antibiotik golongan sefalosporin generasi ketiga yang bersifat spektrum luas. Setiap golongan antibiotik memiliki cara kerja yang berbeda. Untuk mengetahui bagaimana kerja suatu agen antimikroba atau antibiotik, perlu dipahami struktur sel suatu bakteri dan bagaimana

Pradnyadhita, A., dkk.,: ¹ Identifikasi dan Uji Sensitivitas Bakteri *Neisseria Gonorrhoeae* Terhadap Antibiotik Sefiksim Pada Pekerja Seks Komersial di Puskesmas II Denpasar Selatan

suatu agen antimikroba tersebut bekerja terhadap sel target pada bakteri¹⁹. Mekanisme kerja dari antibiotik golongan sefalosporin adalah dengan menghambat sintesis dinding sel suatu bakteri dengan mengikat Penicillin-Binding Protein (PBP) sebagai reseptor obat yang terdapat dalam membran sitoplasma bakteri *Neisseria gonorrhoeae*. Sehingga dengan menghambat kerja dari PBP akan mencegah ikatan rantai peptida yang mengakibatkan lisisnya dinding sel bakteri dan mempengaruhi struktur sel dan mengakibatkan kematian pada bakteri tersebut²⁰. Resistensi bakteri *Neisseria gonorrhoeae* terhadap antibiotik golongan sefalosporin khususnya sefiksim diduga melalui mekanisme molekuler seperti terbentuknya mosaik penA-X yang

³ mengkode Penicillin-Binding Protein 2 (PBP2) dan terjadi mutasi kromosom sehingga terbentuk varian baru yaitu penA-X. Mosaik gen penA yang mengkode PBPs-2 akan menyebabkan berkurangnya daya ikat penisilin dan sefalosporin yang pada akhirnya akan menyebabkan resistensi atau penurunan kepekaan terhadap sefiksim²¹.

Pada penelitian ini telah berhasil mengidentifikasi dan menguji sensitivitas bakteri *Neisseria gonorrhoeae* terhadap sefiksim. Data penelitian ini sangat penting dalam evaluasi penggunaan antibiotik sefiksim terhadap infeksi gonore sebagai salah satu evaluasi terhadap pengobatan *Neisseria gonorrhoeae* secara epidemiologi di Puskesmas II Denpasar Selatan

KESIMPULAN

Hasil identifikasi menunjukkan 6 dari 30 (20 %) sampel swab vagina Pekerja Seks Komersil yang melakukan pemeriksaan di Puskesmas II Denpasar Selatan terdapat bakteri *Neisseria gonorrhoeae*. Hasil uji

sensitivitas bakteri *Neisseria gonorrhoeae* menunjukkan bahwa semua isolat resisten terhadap sefiksim dengan diameter zona hambat lebih kecil dari 31 mm.

DAFTAR PUSTAKA

- ²³ 1. Sridana ME, Indrayani AW. *Karakteristik Pasien pada Infeksi Menular Seksual (IMS) Pada Puskesmas II Denpasar Selatan Periode Januari– Juni Tahun 2012*. Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. 2012
- ³³ 2. Calonge N. *Screening for HIV: Recommendation statement*. Am Fam Physician. 2005;72(11):2287–98.
- ¹² 3. Casey CG, Rutledge TF, Johnson DC, Boyd MF, Starr TM. *Morbidity and Mortality Weekly Report Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010*. Department Of Health And Human Services. Vol. 59. 2010.
- ¹⁸ 4. Fadly RR, Endriani R, Masadi N. *Identifikasi dan Uji Resistensi Antibiotik terhadap Neisseria Gonorrhoeae Pada*

Pradnyadhita, A., dkk.: ¹ Identifikasi dan Uji Sensitivitas Bakteri *Neisseria Gonorrhoeae* Terhadap Antibiotik Sefiksim Pada Pekerja Seks Komersial di Puskesmas II Denpasar Selatan

- Swab Vagina Pekerja Seks Komersial Wanita (PSKW) di Kawasan Jondul Kel. Rejosari Kec. Tenayan Raya Pekanbaru.* Fak Kedokt Univ Riau. 2013; ³²
5. WHO. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014* [Internet]. France; 2014. Available from: <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillance-report/en/> ²⁸
 6. Leboffe MJ, Pierce BE. *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory*. 4th ed. 2011. 1–266 p. ¹¹
 7. Kemenkes RI. *Pedoman Nasional Penanganan IMS* [Internet]. Pedoman Nasional Penanganan Infeksi Menular Seksual 2011. 2011. 29–34 p. Available from: <http://spiritia.or.id/dokumen/pedoman-ims2011.pdf>
 8. Astindari, Lumintang H, Setyaningrum T. ¹³ *Uji Difusi pada Sefiksim terhadap Neisseria gonorrhoeae pada Servisit Gonore tanpa Komplikasi.* Departemen/ Staf Medik Fungsional Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo Surabaya 2014;26(2):134–8. ³⁶
 9. Soleha TU. *Uji Kepekaan Terhadap Antibiotik.* Juke Unila. 2015;5(9):120. ⁸
 10. Singh V, Bala M, Kakran M, Ramesh V. Comparative assessment of CDS, CLSI disc diffusion and Etest techniques for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*: A 6-year study. *BMJ Open*. 2012;2(4):1–7. ³
 11. Pidari P. *Uji resistensi neisseria gonorrhoeae terhadap beberapa antibiotika pada penderita gonore.* Fakultas Kedokteran Unud RSUP Sanglah Denpasar. 2016. ²⁴
 12. WHO. *Promoting rational use of medicines: core components* [Internet]. Geneva; 2002. Available from: <http://archives.who.int/tbs/rational/h3011e.pdf> ²⁴
 13. Brooks GF, Carroll KC, Butel J, Morse SA, Mietzner T. *Medical Microbiology*. 26th ed. McGraw-Hill. United States; 2013. 1 p. ²⁷
 14. Amira, Abubakar S, Malli, NurmaNurdin E, Bin A. *Gejala Klinis Infeksi Penyakit Menular Seksual Di Puskesmas Siko Kota Ternate Tahun 2016.* J Ris Keperawatan. 2017;6(1):50–3. ⁹
 15. Saginur R, Clecner B, Portnoy J, Mendelson J. *Superoxol (catalase) test for identification of Neisseria gonorrhoeae.* J Clin Microbiol. 1982;15(3):475–7. ⁵²
 16. Nurdin E, Bin A, Abubakar S, Malli NA. *Gejala Klinis Infeksi Penyakit Menular Seksual di Puskesmas Siko Kota Ternate Tahun 2016.* J Ris Kesehat. 2017;6(1):50–3. ⁹
 17. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 27th ed. New York; 2017. ³⁵

- Pradnyadhita, A., dkk.,: ¹ Identifikasi dan Uji Sensitivitas Bakteri *Neisseria Gonorrhoeae* Terhadap Antibiotik Sefiksim Pada Pekerja Seks Komersial di Puskesmas II Denpasar Selatan
18. Santoso P. ²⁵ *Sensitivitas Neisseria Gonorrhoeae Terhadap Beberapa Antibiotika pada Pekerja Seksual Komersial dengan Sevritis Gonore Di Kabupaten Semarang*. Laporan Penelitian Dokter Spesialis, Program Studi Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro. ³¹ 2004.
19. Llor C, Bjerrum L. ¹⁶ *Antimicrobial resistance: Risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. Ther Adv Drug Saf.* 2014;5(6):229–41.
20. Triono AA, Purwoko AE. ²² *Efektifitas Antibiotik Golongan Sefalosporin dan Kuinolon terhadap Infeksi Saluran Kemih* The Mutiara Med. 2012;12(1):6–11.
21. Unemo M, Shafer WM. *Antimicrobial resistance in Neisseria gonorrhoeae in the 21st Century: Past, evolution, and future.* Clin Microbiol Rev. 2014;27(3):587–613.

IDENTIFIKASI DAN UJI SENSITIVITAS BAKTERI *Neisseria gonorrhoeae* TERHADAP ANTIBIOTIK SEFIKSIM PADA PEKERJA SEKS KOMERSIAL DI PUSKESMAS II DENPASAR SELATAN

ORIGINALITY REPORT

49%
SIMILARITY INDEX

48%
INTERNET SOURCES

15%
PUBLICATIONS

11%
STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1 r2kn.litbang.kemkes.go.id **9%**
Internet Source

2 ejournal.poltekkes-denpasar.ac.id **8%**
Internet Source

3 adoc.pub **3%**
Internet Source

4 www.sciencegate.app **3%**
Internet Source

5 www.unud.ac.id **2%**
Internet Source

6 repository.poltekkes-denpasar.ac.id **2%**
Internet Source

7 Submitted to Surabaya University **1%**
Student Paper

8 ecommons.aku.edu **1%**
Internet Source

doaj.org

9	Internet Source	1 %
10	e-journal.unair.ac.id Internet Source	1 %
11	repository.uki.ac.id Internet Source	1 %
12	Submitted to Instituto Nacional de Salud Publica Student Paper	1 %
13	journal.unair.ac.id Internet Source	1 %
14	repository.usu.ac.id Internet Source	1 %
15	Submitted to University of Bristol Student Paper	1 %
16	bmcinfectdis.biomedcentral.com Internet Source	1 %
17	onlineallarticles.blogspot.com Internet Source	1 %
18	www.mitrariset.com Internet Source	1 %
19	eprints.undip.ac.id Internet Source	1 %
20	Submitted to City Colleges of Chicago Student Paper	

1 %

21

Submitted to iGroup

Student Paper

1 %

22

ojs.poltekkes-medan.ac.id

Internet Source

1 %

23

journal.uad.ac.id

Internet Source

1 %

24

Submitted to Monash University

Student Paper

<1 %

25

lib.unnes.ac.id

Internet Source

<1 %

26

journal.fkm.ui.ac.id

Internet Source

<1 %

27

repository.unair.ac.id

Internet Source

<1 %

28

Submitted to Istanbul Aydin University

Student Paper

<1 %

29

digilib.uinsby.ac.id

Internet Source

<1 %

30

we-didview.xyz

Internet Source

<1 %

31

id.scribd.com

Internet Source

<1 %

32	juke.kedokteran.unila.ac.id Internet Source	<1 %
33	pediatrics.aappublications.org Internet Source	<1 %
34	vdocuments.site Internet Source	<1 %
35	Caetano Padial Sabino. "Antimicrobial photodynamic inactivation mediated by methylene blue: Analysis of inactivation kinetics and biochemical mechanisms", Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2021 Publication	<1 %
36	repositori.usu.ac.id Internet Source	<1 %
37	text-id.123dok.com Internet Source	<1 %
38	melaoktariza15.wordpress.com Internet Source	<1 %
39	ojs.akbpstie.ac.id Internet Source	<1 %
40	www.scribd.com Internet Source	<1 %
41	docobook.com	

<1 %

42

ejournal.unisnu.ac.id

Internet Source

<1 %

43

olsanchok.blogspot.com

Internet Source

<1 %

44

repo.ikipgribali.ac.id

Internet Source

<1 %

45

www.docstoc.com

Internet Source

<1 %

46

download.garuda.ristekdikti.go.id

Internet Source

<1 %

47

ejournal.unsrat.ac.id

Internet Source

<1 %

48

ellinjuniarti.blogspot.com

Internet Source

<1 %

49

eprints.ums.ac.id

Internet Source

<1 %

50

jurnal.kesdammedan.ac.id

Internet Source

<1 %

51

www.coursehero.com

Internet Source

<1 %

52

Halimatussa 'diah, Urip Urip, Yunan Jiwintarum. "Variasi Suhu Terhadap

<1 %

Pertumbuhan Neisseria Gonorrhoeae pada Media Coklat Agar Plate", Quality : Jurnal Kesehatan, 2018

Publication

53

perawatnuning.blogspot.com

Internet Source

<1 %

54

repo.unand.ac.id

Internet Source

<1 %

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography On

DIVERSIFIKASI PRODUK DAN PEMANFAATAN VIRGIN COCONUT OIL DALAM BIDANG KESEHATAN PADA KELOMPOK WANITA TANI YAYASAN TAKSU TRIDATU

by I Wayan Karta

Submission date: 30-Sep-2021 01:31PM (UTC+0700)

Submission ID: 1661375313

File name: 25976-59063-1-PB.pdf (422.04K)

Word count: 3113

Character count: 19380

DIVERSIFIKASI PRODUK DAN PEMANFAATAN VIRGIN COCONUT OIL DALAM BIDANG KESEHATAN PADA KELOMPOK WANITA TANI YAYASAN TAKSU TRIDATU

I Wayan Karta ^{1*}, Burhannuddin ², I Nyoman Jirna ³

^{1,2,3} Jurusan Teknologi Laboratorium Medik, Poltekkes Kemenkes Denpasar
Jl. Sanitasi No.1 Sidakarya, Denpasar

iwayankartaganes@gmail.com

Abstrak

KWT Yayasan Taksu Tridatu memiliki lahan kelapa yang luas, namun pengolahan kelapa menjadi produk ekonomis belum dilakukan, sehingga dibutuhkan pelatihan membuat VCO dan diversifikasinya. Hal ini dilakukan selain nantinya memperoleh keuntungan secara ekonomis, tetapi dapat meningkatkan kualitas kesehatan dengan memanfaatkan VCO dalam terapi perawatan dan mengatasi berbagai macam penyakit. Metode pengabdian yang dilakukan dalam kegiatan pengabdian pada masyarakat ini yaitu pelatihan dan pendampingan, pembuatan media promosi, penelusuran kerjasama. Jenis permasalahan yang ditangani dalam program ini meliputi aspek produksi dan manajemen usaha VCO serta pemanfaatannya dalam bidang kesehatan. Aspek produksi dengan melatih ibu-ibu memproduksi VCO (pembuatan, kontrol kualitas, diversifikasi, pengemasan), sedangkan manajemen usaha dengan mengadakan kerjasama dengan penginapan, rumah makan, warung, toko oleh-oleh di Nusa Penida. Hasil kegiatan ini meliputi (1) KWT Yayasan Taksu Tridatu memiliki keterampilan dalam pembuatan VCO dan diversifikasi produknya menjadi VCO dengan aromaterapi jasmun dan cendana; (2) Kelompok mitra binaan memiliki keterampilan mengolah limbah blondo menjadi sabun alami dengan serbuk daun kelor dan daun intaran; (3) Kelompok mitra binaan memiliki aktivitas memproduksi VCO dan diversifikasinya untuk dipasarkan ataupun dimanfaatkan untuk kesehatan; (4) Pemahaman mitra binaan dapat meningkat dengan adanya pelatihan yang telah dilakukan dari hasil pre tes dan pos tes yang telah dilakukan.

Kata kunci: virgin coconut oil, sabun organik, aromaterapi, kelapa

Abstract

The Taksu Tridatu Foundation's women's farmer group has a large coconut area, but the processing of coconut into an economic product has not been carried out, so training is needed to make VCO and its diversification. This is expected to improve the quality of health by utilizing VCO in therapeutic treatments and overcoming various diseases. Service methods carried out in community service activities are training and mentoring, making promotional media, tracking cooperation. The types of problems handled in this program include aspects of production and business management of VCO and their use in the health sector. The production aspect is by training women to produce VCO (manufacturing, quality control, diversification, packaging), while business management is carried out by collaborating with inns, restaurants, stalls, souvenir shops in Nusa Penida. The results of this activity include (1) female farmers have skills in making VCO and aromatherapy products of jasmun and sandalwood; (2) female farmers have the skills to process blondo waste into natural soap; (3) female farmers have activities to produce VCO and diversify them to be marketed or used for health; (4) The understanding of the fostered partners can be improved with the training that has been done.

Keywords: virgin coconut oil, organic soap, aromatherapy, coconut

1. PENDAHULUAN

Nusa Penida merupakan salah satu kecamatan yang ada di Kabupaten Klungkung. Nusa Penida sekarang ini merupakan salah satu kawasan wisata favorit di Bali dan memberikan perubahan terhadap aktivitas masyarakat. Untuk mencapai pulau ini harus menyebrangi selat Badung menggunakan speed boat, ferry, ataupun perahu. Adanya kemajuan yang pesat ini tentu dibutuhkan kesiapan sumber daya manusia dan kesehatan masyarakatnya, sehingga pariwisata memberikan dampak positif terhadap ekonomi dan kesehatan masyarakat. Selama ini belum ada produk lokal Nusa Penida yang menjadi produk oleh-oleh, sehingga ke depannya dibutuhkan suatu produk lokal yang bernilai ekonomis. Produk yang bisa dikembangkan yaitu produk virgin coconut oil (VCO) di desa Ped, kecamatan Nusa Penida, Kabupaten Klungkung. Produk ini sangat baik dikembangkan dengan memberdayakan komunitas wanita tani yang ada di desa ini. Salah satu komunitas yang ada di desa Ped adalah kelompok wanita tani (KWT) Yayasan Taksu Tridatu.

KWT Yayasan Taksu Tridatu telah terorganisir dan melakukan berbagai kegiatan seperti pertanian organik di pekarangan, pengelolaan sampah dan membuat olahan pangan lokal. Masing-masing anggota memiliki kebun kelapa yang luas dan biasanya kelapa hanya diolah menjadi minyak goreng dan hasil limbahnya digunakan sebagai pakan ternak. Kelompok ini mengetahui kelapa dapat diolah menjadi VCO, namun masih terkendala pengetahuan dan cara pembuatannya. Oleh karena itu, KWT ini menginginkan adanya pelatihan pembuatan VCO dan diversifikasi produk serta pemanfaatan produk dalam kesehatan. Hal ini dibutuhkan selain nantinya memperoleh keuntungan secara ekonomis tetapi dapat meningkatkan kualitas kesehatan dengan memanfaatkan VCO dalam terapi perawatan dan mengatasi berbagai macam penyakit. VCO bermanfaat untuk kesehatan seperti antiinflamasi, antianalgesik, antipiretik, antioksidan, dan antimikroba (Dumancas et al., 2016).

Peluang untuk mengembangkan produk olahan kelapa berupa VCO di Desa Ped masih terbuka lebar karena permintaan pasar yang meningkat seiring dengan pertumbuhan penduduk dan kemajuan ilmu pengetahuan yang menyadari keunggulan dari VCO yang baik bagi kesehatan dengan harga yang sangat terjangkau untuk semua kalangan. Selain itu lokasi KWT sangat dekat dengan pelabuhan sehingga mempermudah dalam hal pemasaran. VCO merupakan produk yang memiliki prospek ke depan, karena memiliki manfaat yang banyak untuk kesehatan dan menjadi produk unggulan Nusa Penida sebagai kawasan destinasi wisata. Hal ini didukung pula Yayasan Taksu Tridatu yang

memiliki training center akan menjadi tempat belajar atau kunjungan bagi wisatawan tentang kegiatan KWT dan termasuk dalam jaringan ekowisata desa (JED).

Kegiatan pengabdian masyarakat ini memiliki tujuan sebagai berikut: (1) memberikan pendampingan dan pelatihan mengenai produksi VCO dan diversifikasi produknya; (2) memberikan pendampingan tentang cara pengemasan dan teknik pemasaran produk; (3) memberikan buku pedoman tentang deskripsi produk VCO dan manfaatnya dalam bidang kesehatan; (4) memberikan teknik sederhana dalam memanfaatkan VCO dalam mengatasi permasalahan kesehatan.

2. BAHAN DAN METODE

Metode pengabdian yang dilakukan dalam kegiatan pengabdian pada masyarakat ini yaitu pelatihan dan pendampingan, pembuatan media promosi, penelusuran kerjasama. Pelatihan dan pendampingan dilakukan dalam kegiatan proses pengolahan kelapa menjadi VCO, cara pengemasan dan teknik pemasarannya, serta pola pemanfaatan VCO dalam bidang kesehatan. Pendampingan dilakukan agar kelompok mitra sampai terampil memproduksi produk VCO dan diversifikasinya serta memahami pemanfaatannya dalam bidang kesehatan. Pada kegiatan pelatihan diberikan pre test dan post test untuk mengetahui peningkatan pemahaman peserta. Adanya peningkatan pemahaman dapat dilihat dari analisis nilai pretest dan posttest yang berbeda nyata. Pembuatan media promosi dilakukan untuk memberikan bentuk media yang digunakan pada saat memasarkan kepada masyarakat luas, sehingga dapat mempermudah mitra melakukan promosi. Penelusuran kerjasama dilakukan untuk memperkuat dan menjaga keberlanjutan program. Kerjasama ini antara kelompok mitra dengan kampus, kelompok mitra dengan pelaku wisata, sehingga ke depannya produk yang dihasilkan memiliki kelancaran dalam proses produksi dan penjualannya. Kegiatan yang dilaksanakan dalam pengabdian masyarakat yaitu: (1) Koordinasi kegiatan, dilakukan dengan KWT Taksu Tridatu mengenai persiapan pelaksanaan kegiatan serta tenaga lapangan yang membantu dalam proses pelatihan; (2) Penentuan jadwal pelatihan dan pendampingan, dilakukan setelah kegiatan koordinasi, sehingga diperoleh jadwal yang sesuai dengan kesibukan peserta dan waktu dalam pelatihan; (3) Penyusunan Booklet Tentang VCO dan pemanfaatannya, disusun oleh pengabdian dan diberikan kepada peserta; (4) Persiapan alat dan bahan pelatihan seperti peralatan dalam pembuatan santan untuk VCO dan sabun, bahan kelapa dan bahan pembuatan sabun organik (NaOH, serbuk daun kelor dan daun intaran); (5) Pelatihan, dalam kegiatan pelatihan dilakukan terlebih dahulu mengenai pemaparan tentang

VCO dan prospek ke depannya, serta manfaatnya bagi kesehatan. Sebelum dilakukan pelatihan, peserta diberikan pre test. Kemudian di akhir kegiatan pelatihan, peserta diberikan post test. Pendistribusian buku VCO juga dibagikan saat kegiatan pelatihan. Urutan kegiatan pelatihan meliputi pemberian pre test, pemaparan materi, Tanya jawab, pemberian buku dan brosur, pembuatan VCO, serta pengemasan dan pelabelan. Dalam pembuatan VCO, produk yang dihasilkan yaitu VCO original dan aromaterapi. Dalam kegiatan pelatihan, peserta dibagi menjadi tiga kelompok setiap harinya. Tujuannya agar tetap dapat dilakukan protokol kesehatan, seperti jaga jarak, penggunaan masker, dan pembatasan berkerumun maksimal 25 orang; (6) Pendampingan, dilakukan saat kegiatan pelatihan dan setelah pelatihan. Tujuannya adalah memberikan bimbingan dan dampingan kepada peserta dalam proses pembuatan VCO dan memotivasinya untuk terus melakukan produksi serta membantu dalam proses pemasaran; (7) Pemasaran Produk, produk VCO merupakan produk yang aman bagi kesehatan, sehingga setelah pelatihan, produk VCO yang telah dikemas langsung dipasarkan. Pemasaran dilakukan di warung-warung, restaurant, dan toko strategis di Nusa Penida, homestay atau villa di Nusa Penida, jasa spa, kampus Poltekkes Kemenkes Denpasar, serta melalui media social; (8) Penelusuran Kerjasama, dilakukan dengan memilih warung-warung, restaurant, dan toko strategis di Nusa Penida, homestay atau villa di Nusa Penida, dan kampus Poltekkes Kemenkes Denpasar; (9) Evaluasi Kegiatan, dilakukan dengan memberikan post test setelah pelatihan, serta evaluasi hasil produksi dan penjualan produk.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Kegiatan pengabdian dilakukan dari kegiatan peninjauan, pelaksanaan kegiatan dan tindak lanjut kegiatan. Pelaksanaan pelatihan dilakukan pada tanggal 17, 18, dan 19 Agustus 2020. Peserta yang terlibat dalam pelatihan ini adalah kelompok wanita tani Yayasan Taksu Tridatu sebanyak 30 orang. Dalam proses pelatihan yang dilakukan selama tiga hari, peserta dibagi menjadi tiga kelompok. Pelatihan yang diberikan adalah pemilihan kelapa yang baik, alat-alat yang akan digunakan dalam pembuatan VCO, teknik pembuatan santan, teknik fermentasi VCO, pemanenan atau penyaringan VCO, serta teknik pengemasan dan pemasaran. Pada saat proses pelatihan dibagikan pamflet, brosur tentang pembuatan VCO dan buku tentang pemanfaatan VCO.

Kelapa yang dipergunakan dalam proses pembuatan VCO adalah kelapa yang tua, tidak busuk, warna kulit kelapanya cokelat, dan belum tumbuh tunas (Karta & Sarasmita, 2013). Alat-alat yang dipergunakan dalam pembuatan VCO harus tersendiri dan tidak bercampur dengan peralatan dapur lainnya. Hal

ini perlu dilakukan agar dalam proses pembuatan, VCO tidak terkontaminasi atau ada bau. Pada pembuatan santan, kelompok tani menggunakan air hangat untuk mencampurkan dengan kelapa yang telah diparut. Kemudian, diperas dengan baik. Proses pemerasan ini merupakan proses yang sangat penting. Kekuatan dalam memeras akan berdampak pada banyak atau sedikit VCO yang dihasilkan. Dalam kegiatan pelatihan ini, masyarakat diberikan masing-masing sepuluh butir kelapa untuk diproduksi menjadi VCO di rumahnya masing-masing setelah proses pelatihan.

Pada proses pelatihan, kelompok 1 dengan 20 butir kelapa memperoleh VCO sebanyak 2,3 liter VCO; kelompok 2 memperoleh 1,7 liter VCO, dan kelompok 3 memperoleh 2 liter VCO. Kelompok 2 lebih sedikit memperoleh VCO karena pesertanya lebih banyak peserta muda, sehingga tidak banyak berpengalaman dalam memeras santan. Blondo dengan VCO yang belum terpisah kemudian disaring dengan sederhana menggunakan corong yang diisi kertas saring dan kapas. Kelompok tani menyampaikan dalam proses pembuatan VCO, proses pengambilan VCO dari blondonya merupakan proses yang sulit. Hal ini karena, jika salah dalam pengambilan maka bisa bercampur dengan air ataupun menjadi kotor. Ini ditandai dengan warna VCO yang keruh putih, tidak bening seperti air.

Pada pelatihan, juga diberikan teknik pengemasan dan pembuatan campuran dengan aromaterapi. Aroma yang digunakan yaitu jasmine dan cendana. Pelatihan ini dilakukan untuk membuat variasi produk tentang VCO. Dalam proses pengemasan, masyarakat juga diberikan pemahaman tentang pemanfaatan VCO untuk kesehatan, perawatan kulit dan rambut. Pemahaman ini dilakukan agar masyarakat dapat secara mandiri dapat memasarkan produk yang telah dibuat. Setelah hasil pelatihan, dilakukan tindak lanjut pembuatan VCO di masing-masing rumah tangga. Rata-rata mereka peroleh dengan 10 butir kelapa adalah 800 – 1200 mL VCO. VCO yang telah dibuat ada yang dipergunakan sendiri untuk pijat bayi, sebagai minyak urut, dan ada yang dijual. Penjualan dilakukan secara mandiri dan juga dipajang di outlet produk khas Nusa Penida Rumah Belajar Taksu Tridatu.



Gambar 1 Pelatihan dan VCO yang dihasilkan dari pelatihan

Pada pelatihan ini untuk mengetahui adanya perubahan pemahaman pada peserta, maka dibagikan kuisioner. Dalam kuisioner terdapat 20 pertanyaan yang berisi tentang pemahaman tentang VCO, teknik pembuatan, dan manfaatnya untuk kesehatan. Hasil uji nilai pre dan post tes dihasilkan pada Tabel 1.

Tabel 1 Paired Samples Statistics

Paired Samples Statistics					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	pretest	68.17	30	14.049	2.565
	Posttest	81.83	30	5.645	1.031

Tabel Paired Samples Statistics menunjukkan data deskriptif masing-masing variabel pada sampel berpasangan. Pada awal mempunyai nilai rata-rata (mean) 68,17 dari 30 data. Sebaran data (Std. Deviation) yang diperoleh adalah 14,049 dengan standar error 2,565. Tes akhir mempunyai nilai rata-rata (mean) 81,83 dari 30 data. Sebaran data (Std.Deviation) yang diperoleh 5,645 dengan standar error 1,031. Hal ini menunjukkan tes akhir pada data lebih tinggi dari pada tes awal. Rentang sebaran data tes akhir menjadi semakin sempit dan dengan standar error yang semakin rendah.

Tabel 2 Paired Samples Test

Paired Samples Test									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	pretest - Posttest	-13.667	13.954	2.548	-18.877	-8.456	-5.364	29	.000

Berdasarkan Tabel 1, nilai signifikansi (2-tailed) adalah 0.000 ($p < 0.05$). Sehingga hasil test awal dan test akhir mengalami perubahan yang signifikan (berarti). Berdasarkan statistika deskriptif tes awal dan tes akhir terbukti test akhir lebih tinggi. Oleh karena itu dapat disimpulkan pelatihan pembuatan VCO dapat meningkatkan pemahaman kelompok tani tentang pembuatan VCO. Berdasarkan hasil SEM, VCO memberikan efek kerusakan dan membuat lubang pada dinding sel bakteri (Widianingrum et al., 2019). Kandungan asam laurat dalam VCO memiliki sifat efek antibakteri, antivirus, dan antipprotozoa. Asam laurat dapat membunuh bakteri gram positif dengan merusak membran sel bakteri, dan menyebabkan terjadinya lisis membran dan pertumbuhan bakteri menjadi terhambat (Gayatri et al., 2017). VCO dapat sebagai antiinflamasi dengan cara menekan penanda inflamasi dan melindungi kulit melalui peningkatan fungsi pelindung kulit (Varma

et al., 2019). VCO mengandung asam laurat yang berfungsi untuk menghaluskan dan melembabkan kulit (Atmanto, 2019). Penggunaan VCO dalam penatalaksanaan dermatitis atopik merupakan salah satu terapi topikal yang terbukti memiliki efek terapeutik yang baik dan aman untuk topikal. Studi telah membuktikan bahwa VCO menunjukkan sifat antioksidan, anti-inflamasi, antibakteri, penyembuhan luka, dan pelembab yang sangat penting dalam pengelolaan dermatitis atopik (Yik-Ling Chew, 2018).

Selain pembuatan VCO, kegiatan lainnya yang dilakukan sebagai tindak lanjut saat pelatihan adalah pemanfaatan blondo yang masing mengandung minyak kelapa diolah menjadi sabun. Sabun yang dibuat merupakan hasil dari campuran minyak dari blondo dengan bahan-bahan alam yang ada di Nusa Penida, seperti daun kelor dan daun intaran yang telah kering. Cara pembuatannya sangat sederhana dengan memberikan tambahan campuran dengan simplisia masing-masing daun tersebut. Hasilnya diperoleh sabun yang berbentuk unik dengan kualitas yang lebih baik, karena minyak blondo memiliki kandungan hampir sama dengan minyak VCO.

Sabun dari blondo VCO dengan perpaduan daun kelor (*Moringa oleifera* Lam) dan daun intaran (*Azadirachta indica* A. Juss) dapat dimanfaatkan untuk perawatan kulit dan antibakteri. Daun kelor merupakan tanaman yang memiliki banyak manfaat di bidang kesehatan. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor mengandung flavonoid, saponin, terpenoid dan tanin. Ekstrak daun kelor memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (Yunita et al., 2020). Sabun dari bahan ekstrak daun intaran atau mimba memiliki manfaat untuk kesehatan kulit, diantaranya penggunaan sabun padat ekstrak daun mimba berpengaruh terhadap proses penyembuhan lesi scabies grade II (Murniati & Rohmawati, 2018). Kedua jenis sabun ini termasuk dalam jenis sabun organik. Sabun organik berbahan alami memiliki peluang untuk dipasarkan pada tempat wisata seperti penginapan dan spa di Bali (Ayu et al., 2021). Dengan demikian hasil kegiatan pembuatan sabun organik memberikan manfaat untuk kebutuhan sehari-hari sebagai sabun antibakteri dan juga dipasarkan pada pelaku pariwisata yang memiliki jasa penginapan dan spa. Pembuatan sabun ini ke depannya dapat juga dengan menambahkan ekstrak-ekstrak bunga seperti bunga kenanga (Rita et al., 2019). Selain itu dapat dipadukan dengan membuat sabun padat transparan dari limbah blondo dan VCO dengan ekstrak teh putih (Widyasanti & Hasna, 2016).



Gambar 2 Pembuatan sabun alami dari minyak blondo dan bahan alam

Hasil kegiatan pelatihan ini diberikan kesempatan mengikuti pameran di Edu Health Fair Kementerian Kesehatan RI yang diselenggarakan di Mall Taman Angrek pada tanggal 4 – 6 Nopember 2020.

Kelompok wanita tani saat akhir pelatihan menyampaikan bahwa dibutuhkan kerjasama ke depannya dengan pihak kampus dalam membantu pemasaran produk dan pengembangan diversifikasi produk lainnya dari proses pembuatan VCO. Contohnya pemanfaatan limbah “usam” kelapa parut sisa pembuatan santan, air kelapa, batok kelapa, dan serabut kelapa. Kelompok ini mengharapkan terus dilakukan kegiatan pengabdian selanjutnya sehingga mereka bisa meningkatkan perekonomian dengan variasi produk berbasis kelapa. Variasi tersebut seperti pemanfaatan VCO untuk pembuatan lotion. Lotion VCO dapat dikembangkan dengan menambahkan bahan lainnya seperti lidah buaya, minyak mawar (Satheeshan et al., 2020).

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil kegiatan dapat disimpulkan dari kegiatan pengabdian pada masyarakat ini adalah (1) Kelompok wanita tani (KWT) Yayasan Taksu Tridatu memiliki keterampilan dalam pembuatan VCO dan diversifikasi produknya menjadi VCO dengan aromaterapi jasmir dan cendana; (2) kelompok mitra binaan memiliki keterampilan mengolah limbah blondo menjadi sabun alami; (3) Kelompok mitra binaan memiliki aktivitas memproduksi VCO dan diversifikasinya untuk dipasarkan ataupun dimanfaatkan untuk kesehatan, pemahaman mitra binaan dapat meningkat dengan adanya pelatihan yang telah dilakukan dari hasil pre tes dan pos tes yang telah dilakukan..

28

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih Poltekkes Kemenkes Denpasar yang telah memberikan kesempatan dan pendanaan untuk melakukan pengabdian pada masyarakat pada tahun periode 2020.

DAFTAR PUSTAKA

- Atmanto, D. (2019). Effectiveness of utilizing VCO oil and castor oil on natural creams for dry skin treatment due to environmental factors. Effectiveness of utilizing VCO oil and castor oil on natural creams for dry skin treatment due to environmental factors. *Journal of Physics: Conference Series*. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1402/2/022093>
- Ayu, G., Lestari, D., Cahyadi, K. D., & Esati, N. K. (2021). Penyuluhan dan Pelatihan Pembuatan Sabun Padat Organik di Desa Peguyangan Denpasar. *DINAMISIA: Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*, 5(1), 54–59.
- Dumancas, G., Viswanath, L. C. K., Maples, R. D., & Koralege, R. H. (2016). *Health benefits of virgin coconut oil* (B. Holt (ed.); Issue March). Nova Science Publishers, Inc.
- Gayatri, A., Fauziah, E., & Suharsini, M. (2017). Antibacterial effect of virgin coconut oil on the viability of chromogenic bacteria that causes dental black stain in children. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 9(Special Issue), 83–86. <https://doi.org/10.22159/ijap.2017.v9s2.20>
- Karta, I. W., & Sarasmita, N. M. A. (2013). Analisis Virgin Coconut Oil (Vco) Dan Pengembangan Diversifikasi Produknya Pada Kwt Balicocos Desa. *Seminar Nasional FMIPA UNDIKSHA III*, 239–246.
- Murniati, A., & Rohmawati, I. (2018). The Influence Of Using Extract Neem Leaf (Azadirachta indica A. juss) Soap In The Scabies lesions grade II Healing. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*, 4(3), 140–146.
- Rita, W. S., Suirta, I. W., & Sahara, E. (2019). Pemanfaatan vco dan ekstrak bunga kenanga dalam pembuatan sabun antibakteri di desa ababi kecamatan abang karangasem. *BULETIN UDAYANA MENGABDI*, 18(April), 65–71.
- Satheeshan, K. N., Seema, B. R., & Manjusha, A. V. M. (2020). Development of virgin coconut oil based body lotion. *The Pharma Innovation Journal*, 9(5), 96–101. <http://www.thepharmajournal.com>
- Varmah, R., Sivaprakasam, T. O., Arumugam, I., Dilip, N., Raghuraman, Pavan, K. B., Ra, M., & Paramesh, R. (2019). Journal of Traditional and Complementary Medicine In vitro anti-inflammatory and skin protective properties of Virgin

- coconut oil. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 9, 5–14.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.06.012>
- Widianingrum, D. C., Noviandi, C. T., & Salasia, S. I. O. (2019). Antibacterial and immunomodulator activities of virgin coconut oil (VCO) against *Staphylococcus aureus*. *Heliyon*, 5(10), e02612.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02612>
- 7 Widyasanti, A., & Hasna, A. H. (2016). Kajian pembuatan sabun padat transparan basis minyak kelapa murni dengan penambahan bahan aktif ekstrak teh putih. *Jurnal Penelitian Teh Dan Kina*, 19(2), 179–195. 13
- Yik-Ling Chew. (2018). The Beneficial Properties of Virgin Coconut Oil in Management of Atopic 26 matitis. *Pharmacogn. Rev.*, 1(2), 8–15.
<https://doi.org/10.4103/phrev.phrev>
- Yunita E., Permatasari, D. G., & Lestari, D. (2020). ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MORINGA LEAVES EXTRACT AGAINST *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari Erma*

Yunita, 189–195.

DIVERSIFIKASI PRODUK DAN PEMANFAATAN VIRGIN COCONUT OIL DALAM BIDANG KESEHATAN PADA KELOMPOK WANITA TANI YAYASAN TAKSU TRIDATU

ORIGINALITY REPORT

17%

SIMILARITY INDEX

15%

INTERNET SOURCES

9%

PUBLICATIONS

5%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	www.advernesia.com Internet Source	3%
2	Submitted to Chapman University Student Paper	2%
3	smujo.id Internet Source	1%
4	Sakila ., Rahman, Vicky V.J. Palenewen, Femi H. Elly. "ANALISIS KELAYAKAN AGROINDUSTRI VIRGIN COCONUT OIL(STUDI KASUS KELOMPOK TANI ANUGRAH KELURAHAN TANDURUSA KECAMATAN AERTEMBAGA KOTA BITUNG)", AGRI-SOSIOEKONOMI, 2016 Publication	1%
5	jurnal.unej.ac.id Internet Source	1%
6	journal.uniga.ac.id Internet Source	1%

repository.wima.ac.id

7	Internet Source	1 %
8	jurnalmahasiswa.unesa.ac.id Internet Source	1 %
9	innovareacademics.in Internet Source	1 %
10	jurnal.unimed.ac.id Internet Source	1 %
11	F Rahmandari, F Swastawati, R A Kurniasih. "Quality Characteristics of Body Cream with the Addition of Gelatin from Tilapia (Oreochromis niloticus) Scales as an Emulsifier", IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021 Publication	<1 %
12	Submitted to Direktorat Pendidikan Tinggi Keagamaan Islam Kementerian Agama Student Paper	<1 %
13	journals.cambridgemedia.com.au Internet Source	<1 %
14	repository.stei.ac.id Internet Source	<1 %
15	prosiding-pkmcsr.org Internet Source	<1 %
16	www.researchgate.net Internet Source	

<1 %

17

journal.unilak.ac.id

Internet Source

<1 %

18

publikasi.polije.ac.id

Internet Source

<1 %

19

Submitted to Universiti Sains Malaysia

Student Paper

<1 %

20

id.scribd.com

Internet Source

<1 %

21

docplayer.info

Internet Source

<1 %

22

mejorconsalud.as.com

Internet Source

<1 %

23

ojs.unud.ac.id

Internet Source

<1 %

24

summer-absolutely.icu

Internet Source

<1 %

25

www.coursehero.com

Internet Source

<1 %

26

Imelda Angeles-Agdeppa, Jacus S. Nacis, Mario V. Capanzana, Fabian M. Dayrit, Keith V. Tanda. "Virgin coconut oil is effective in lowering C-reactive protein levels among

<1 %

27

Asep Abdul Rahman, Nunung Yulia, Eva Dania Kosasih. "OPTIMALISASI PEMANFAATAN KUNYIT DALAM PENINGKATAN STATUS KESEHATAN DAN KEMANDIRIAN EKONOMI MASYARAKAT KELURAHAN KAHURIPAN KOTA TASIKMALAYA", JCES | FKIP UMMat, 2018

Publication

<1 %

28

idoc.pub

Internet Source

<1 %

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography On

Penyuluhan Kesehatan dan Pemeriksaan Skrining HBsAg dengan Metode Rapid Test Pada Siswa SMK Pariwisata Di Wilayah Ubud

by Burhannuddin Burhannuddin

Submission date: 11-Oct-2021 11:40AM (UTC+0700)

Submission ID: 1670761019

File name: meriksaan_Skrining_HBsAg_Dengan_Metode_Rapid_Test_pada_Siswa.pdf (365.62K)

Word count: 3232

Character count: 19677

Penyuluhan Kesehatan dan Pemeriksaan Skrining HBsAg dengan Metode Rapid Test Pada Siswa SMK Pariwisata Di Wilayah Ubud

Burhannuddin¹, Cok Dewi Widhya Hana Sundari¹, I Wayan Merta¹, I Gede Sudarmanto¹, I Gusti Agung Dewi Sari¹, I Nyoman Jirna¹, Heri Setiyo Bekt¹, Ida Ayu Mede Sri Arjani¹, Nyoman Mastra¹, I Gusti Ayu Sri Dhyana Putri¹, I Wayan Karta¹, Nur Habibah¹

¹Poltekkes Kemenkes Denpasar, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis

Email penulis korespondensi (^K): boerhannuddin@gmail.com

Abstract

Early detection of hepatitis B in adolescents needs to be done considering the number of this age group in Indonesia is quite large and will soon enter productive age. This community service activity aims to increase knowledge about risk factors and how to control hepatitis B and to get an overview of the HBsAg examination results of the Ubud Region Tourism Vocational School students. The activity was carried out at SMK Pariwisata Kertayasa and SMK Pariwisata Ganesha Ubud with a total of 180 students involved. Students are given health education about risk factors and how to control hepatitis B through direct exposure methods and leaflets. The screening examination was carried out by checking the HBsAg antigen and anti-HBs blood by using the rapid test method. Most of the students who became respondents were between 16-18 years old, as many as 177 people (98.33%) and 132 people (73.33%) female. After being given health education, 94% of students had good knowledge about hepatitis B, an increase from 25% before being given counseling. The results of the screening examination showed that 1 student (0.56%) was infected with the Hepatitis B virus (positive HBsAg) and 3 (1.67%) students had immunity to the Hepatitis B virus (Anti-HBs Positive). Public Health Center (PHC) or institutions engaged in Hepatitis B control should increase health promotion programs to schools so as to increase students' awareness and awareness of hepatitis B infection. Hepatitis B screening should be used as one of the school programs in collaboration with local PHC.

Keywords: Health education, HBsAg Screening, Hepatitis B

Pendahuluan

Hepatitis merupakan masalah kesehatan masyarakat dunia terutama di negara-negara berkembang termasuk Indonesia. Sebagian besar morbiditas dan mortalitas akibat Hepatitis virus berhubungan dengan Hepatitis B dan Hepatitis C yang kronis (KEMENKES RI, 2016). Berdasarkan data Riskesda 2017, sebanyak 7,1% penduduk Indonesia mengidap Hepatitis B. Jumlah ini sedikit lebih kecil dari data Riskesda 2013, sebesar 7.2 %. Sekitar 65% dan 75% dari orang-orang dengan HBV kronis dan infeksi HCV, masing-masing tidak menyadari status mereka. Sekitar 50%

dari orang-orang ini memiliki penyakit hati yang berpotensi kronis dan 10% berpotensi menuju fibrosis hati yang dapat menyebabkan kanker hati.

5 Salah satu cara pencegahan hepatitis B adalah dengan pemberian imunisasi. Pengendalian Hepatitis B dimulai dari penanganan pada ibu hamil yang mengidap hepatitis B serta pemberian imunisasi pada bayi yang dilahirkan akan memutus rantai pertama penularan penyakit hepatitis B. Pemberian imunisasi pada bayi ini merupakan langkah kunci dalam menciptakan generasi baru yang bebas Hepatitis B (KEMENKES RI, 2013).

Imunisasi Hepatitis B di Indonesia umumnya diberikan pada kelompok usia dini (bayi) dan masih jarang program imunisasi atau pemeriksaan yang ditujukan untuk kelompok remaja. Remaja termasuk kelompok usia yang beresiko terkena hepatitis B melalui berbagai cara penularan dan perlu dilakukan pencegahan sedini mungkin. Sebelum diberikan vaksinasi hepatitis B, status kesehatan remaja terhadap hepatitis B perlu diketahui dengan melakukan pemeriksaan skrining hepatitis B, dapat dengan cara mengecek ada tidaknya antigen virus di dalam tubuh atau 32 kekebalan tubuh terhadap virus hepatitis B.

1 Deteksi dini hepatitis B pada remaja perlu dilakukan mengingat jumlah kelompok usia ini di Indonesia cukup besar dan akan segera memasuki usia produktif. Hasil skrining HBsAg pada kelompok usia < 30 tahun yang mendonorkan darah menunjukkan persentase HBsAg positif paling banyak. Sebanyak 3.61% sampel darah donor ditemukan positif HBsAg dengan presentase terbanyak dari kelompok umur < 30 tahun (39,01%) (Ventiani dkk, 2014). Skrining Hepatitis B pada remaja di Surabaya dengan metode rapid test menunjukkan 3.7% positif HBsAg (Hadi dan Alamudi, 2017). 31 Status kesehatan terhadap Hepatitis B pada 13 kelompok remaja sangat penting diketahui karena mereka tidak lama lagi akan menikah dan mempunyai anak. Setelah skrining remaja dapat disarankan untuk melakukan imunisasi Hepatitis B atau pemeriksaan dan terapi lebih lanjut bagi yang dinyatakan positif HBsAg.

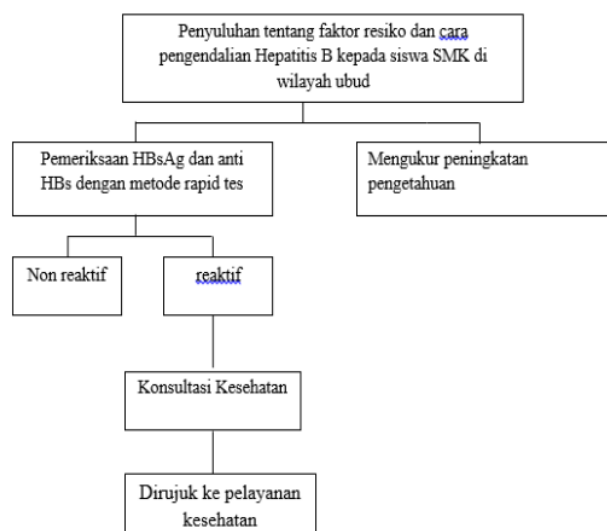
Selain untuk mengetahui status kesehatan melalui skrining hepatitis B, meningkatkan pengetahuan umum remaja tentang hepatitis B dapat menjadi salah satu strategi untuk mengendalikan penyebaran penyakit. Dalam pengendalian hepatitis B diperlukan program yang dapat meningkatkan pengetahuan remaja terutama mengenai faktor risiko dan cara pencegahan dan penularan Hepatitis B. Remaja selanjutnya dapat menjadi agen untuk mengedukasi lingkungan sekitarnya tentang cara pengendalian hepatitis B.

Berkenaan dengan hal tersebut, maka dalam program pengabdian masyarakat ini dilakukan kegiatan peningkatan pengetahuan remaja melalui penyuluhan 27 tentang hepatitis B dan pemeriksaan skrining HbsAg pada siswa SMK Pariwisata di Wilayah Ubud. Program ini merupakan bagian dari upaya mengedukasi masyarakat tentang pentingnya pengendalian hepatitis B sekaligus mengetahui prevalensi HbsAg positif pada remaja khususnya siswa SMK Pariwisata di Wilayah Ubud. Perkembangan pariwisata yang pesat di kawasan tersebut dapat menjadi salah satu faktor risiko luar

penyebaran penyakit infeksi seperti Hepatitis B. Status kesehatan terhadap hepatitis B dari siswa-siswa tersebut juga penting diketahui mengingat lulusannya banyak yang berkarier ke luar negeri seperti bekerja di kapal pesiar.

Metode Pengabdian

Kerangka pemecahan masalah dalam kegiatan pengabdian masyarakat ini adalah sebagai berikut:



Gambar 1. Kerangka Pemecahan Masalah

Kegiatan dilaksanakan pada bulan Juli 2019 dengan sasaran yaitu 180 siswa SMK Pariwisata di wilayah Ubud, terdiri atas 102 siswa kelas 12 SMK Pariwisata Kertayasa dan 78 siswa kelas 12 SMK Pariwisata Ganesha Ubud. Metode yang digunakan adalah dengan memberikan promosi kesehatan melalui kegiatan penyuluhan dan skrining hepatitis B dengan metode rapid tes. Tingkat pengetahuan sasaran dievaluasi dengan kuesioner sebelum dan setelah kegiatan dilakukan.

Alat-alat yang digunakan dalam pengabdian masyarakat ini antara lain adalah laptop, LCD Proyektor, sentrifus, dan tourniquet. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan antara lain adalah materi penyuluhan, leaflet, spanduk, banner, kapas steril, spuit 3 ml, alcohol swab, tabung reaksi, serum, strip HBsAg, strip HbsAb, hand glove, dan masker. Pihak-pihak yang dilibatkan antara lain adalah Poltekkes Kemenkes Denpasar, Puskesmas Ubud I, Puskesmas Ubud II, SMK Pariwisata Ganesha Ubud, dan SMK Pariwisata Kertayasa Ubud.

23 Hasil dan Pembahasan

1. Karakteristik responden

Jumlah total responden yang dilibatkan adalah sebanyak 180 siswa, sebanyak 102 orang (56,57%) merupakan siswa dari SMK Kertayasa Ubud dan sebanyak 78 siswa (43,33 %) berasal dari SMK Pariwisata Ganesha Ubud. Distribusi responden berdasarkan asal sekolah dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel. 1. Distribusi Responden Berdasarkan Asal Sekolah

No	Asal Sekolah	Jumlah	%
1	SMK Pariwisata Kertayasa Ubud	102	56,67
2	SMK Pariwisata Ganesha Ubud	78	43,33
TOTAL		180	100.00

Seluruh responden yang dilibatkan merupakan siswa-siswa kelas XII yang berumur antara 15-19 tahun. Berdasarkan karakteristik umur, sebagian besar responden yaitu sebanyak 177 orang (98,33 %) berumur antara 16-18 tahun, 1 orang responden (0,56 %) berumur dibawah 16 tahun, dan 2 orang responden (1,11 %) berumur di atas 18 tahun. Distribusi responden berdasarkan umur dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Distribusi Responden Berdasarkan Umur

No	Umur	Jumlah	%
1	< 16	1	0.56
2	16-18	177	98.33
3	>18	2	1,11
TOTAL		180	100.00

Berdasarkan karakteristik jenis kelamin, sebanyak 48 orang (26,67 %) responden berjenis kelamin laki-laki dan sebanyak 132 orang (73,33 %) berjenis kelamin perempuan. Distribusi responden berdasarkan jenis kelamin dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Distribusi Responden Berdasarkan Jenis Kelamin

No	Umur	Jumlah	%
1	Laki-laki	48	26,67
2	Perempuan	132	73,33
TOTAL		180	100.00

Berdasarkan karakteristik pengetahuan sebelum diberikan penyuluhan kesehatan, sebagian besar responden yaitu sebanyak 108 orang (60 %) memiliki pengetahuan tentang penyakit hepatitis B dengan kategori cukup. Setelah diberikan penyuluhan kesehatan, sebagian besar responden yaitu sebanyak 169 orang (94 %) memiliki pengetahuan tentang penyakit hepatitis B dengan kategori baik. Distribusi responden berdasarkan pengetahuan tentang penyakit hepatitis B, sebelum dan setelah diberikan penyuluhan dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Distribusi responden berdasarkan pengetahuan tentang hepatitis B

No	Kategori	Sebelum Penyuluhan Jumlah	Sebelum Penyuluhan %	Setelah Penyuluhan Jumlah	Setelah Penyuluhan %
1	Kurang	45	25.00	0	0.00
2	Cukup	108	60.00	11	6.00
3	Baik	27	15.00	169	94.00
TOTAL		180	100.00	180	100.00

2. Hasil Pemeriksaan Laboratorium

Hasil pemeriksaan HBsAg dan anti-HBs terhadap 180 responden didapatkan 1 orang (0,56 %) responden menunjukkan HBsAg positif dan 3 orang (1,67%) responden menunjukkan anti-HBs positif. Hasil pemeriksaan skrining hepatitis B dengan metode rapid test dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil pemeriksaan skrining hepatitis B dengan metode rapid test

No	Kategori	HBsAg		Anti-HBs	
		Jumlah	%	Jumlah	%
1	Positif	1	0,56	3	1,67
2	Negatif	179	99,44	177	98,33
TOTAL		180	100.00	180	100.00

Kegiatan pengabdian masyarakat ini dilakukan dalam bentuk penyuluhan kesehatan dan pemeriksaan skrining hepatitis B pada siswa-siswa SMK di wilayah Ubud. Sebagai sekolah kejuruan dalam bidang pariwisata, pemberian informasi kesehatan melalui kegiatan penyuluhan kesehatan tentu merupakan hal yang baru didapatkan oleh siswa-siswa pada kedua sekolah tersebut. Dalam kegiatan ini siswa-siswa tampak antusias mengikuti kegiatan penyuluhan kesehatan baik melalui pemaparan langsung tim pengabdian maupun melalui leaflet yang dibagikan ke masing-masing siswa. Materi penyuluhan yang diberikan adalah tentang faktor risiko dan cara pengendalian hepatitis B dengan harapan terdapat peningkatan pengetahuan siswa tentang penyakit hepatitis B.

Berdasarkan tabel 4 dapat diketahui tingkat pengetahuan siswa sebelum diberikan penyuluhan kesehatan tentang hepatitis B. Sebagian besar siswa memiliki pengetahuan dengan kategori cukup yaitu sebanyak 108 orang (60 %), 27 orang (15 %) dengan kategori baik, dan 45 orang (25 %) dengan kategori kurang. Sebagian besar siswa telah mengenal beberapa karakteristik penyakit hepatitis B seperti faktor penyebab, organ tubuh yang diserang, tanda umum penyakit, dan cara pencegahan melalui vaksinasi. Namun cukup banyak siswa yang belum mengetahui bahwa hepatitis B dapat ditularkan melalui hubungan seksual dan tidak ditularkan melalui makanan. Sejumlah siswa juga belum mengetahui bahwa hepatitis B dapat ditularkan dari ibu hamil ke anak dapat berkembang menjadi penyakit yang lebih berbahaya seperti kanker hati.

Dalam kegiatan penyuluhan, tim pengabdian menjelaskan tentang penyakit hepatitis B terutama terkait faktor resiko, cara pengendalian hepatitis B dan pemeriksaan-pemeriksaan untuk menegakkan diagnosa penyakit. Penyuluhan dilaksanakan melalui pemaparan langsung dan leaflet yang berisi gambar dan informasi-informasi singkat tentang hepatitis B untuk mempermudah siswa mengenal dan memahami lebih mendalam tentang penyakit ini. Kegiatan penyuluhan cukup efektif meningkatkan pengetahuan siswa tentang penyakit hepatitis B. Siswa sebelum diberikan penyuluhan hanya 25% yang memiliki kategori baik, namun setelah diberikan penyuluhan pengetahuan siswa dengan kategori baik meningkat menjadi 94 %. Bahkan tidak ditemukan siswa yang memiliki pengetahuan dengan kategori kurang, yang sebelumnya mencapai 25 %.

Menurut Pratomo (2015) penyuluhan merupakan bentuk pembelajaran non-formal yang dapat dilakukan pada satuan masyarakat tertentu. Dengan menerapkan strategi penyuluhan sangat menentukan tingkat pencapaian pembelajarannya. Pada kegiatan pengabdian masyarakat ini, pemberian penyuluhan kesehatan terhadap siswa-siswa dapat dianggap sebagai solusi yang strategis untuk meningkatkan pengetahuan dan kepedulian siswa terhadap penyakit hepatitis B. Sehingga mendukung upaya jangka panjang dalam mengendalikan penyakit hepatitis B di tengah-tengah masyarakat. Namun yang perlu diperhatikan dalam kegiatan ini adalah pemilihan cara atau strategi penyuluhan yang efektif dengan mempertimbangkan karakteristik responden seperti umur dan latar belakang pendidikan/sekolah.

Setelah diberikan penyuluhan tentang hepatitis B, siswa-siswa selanjutnya diperiksa status kesehatannya terhadap infeksi virus hepatitis B dengan metode pemeriksaan rapid test. Terdapat dua jenis pemeriksaan yang dilakukan yaitu pemeriksaan HBsAg untuk mengetahui adanya infeksi virus hepatitis B di dalam tubuh dan pemeriksaan anti-HBs untuk mengetahui keberadaan antibodi yang dihasilkan tubuh terhadap virus hepatitis B. Pada metode rapid test ini digunakan strip test, baik untuk pemeriksaan HBsAg maupun anti-HBs. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya dua strip, sedangkan hasil negative ditunjukkan dengan adanya 1 strip setelah masing-masing strip test ditetesi dengan serum responden. Dengan metode ini, hasil pemeriksaan akan didapatkan dengan waktu yang relatif lebih cepat sehingga banyak digunakan untuk tujuan skrining hepatitis B.

Berdasarkan tabel 5 dapat diketahui bahwa dari 180 responden, ditemukan satu responden (0,56 %) dengan hasil pemeriksaan HBsAg positif. Hasil positif HBsAg ini menunjukkan keberadaan virus hepatitis B di dalam tubuh responden. Virus hepatitis B memiliki antigen permukaan yaitu HBsAg (*hepatitis B surface antigen*) yang dapat diidentifikasi dengan metode rapid test ini. Keberadaan HBsAg di dalam tubuh dapat digunakan sebagai indikator adanya infeksi akut virus Hepatis B. Responden dengan hasil HBsAg positif dalam pemeriksaan ini tidak menunjukkan gejala sakit apapun, namun hasil tersebut menandakan bahwa virus didalam tubuh bereplikasi yang selanjutnya dapat menginfeksi hati dan menularkan kepada orang lain.

² Menurut Sherlock et al (2002), HBsAg dapat dijumpai selama perjalanan infeksi virus Hepatitis B. Pada infeksi akut dapat dijumpai pada saat munculnya gejala hepatitis, sedangkan pada infeksi virus Hepatitis B kronik dapat dijumpai pada fase immune tolerance dan immune clearance, yang merupakan fase replikatif virus Hepatitis B. Pada fase integrasi yang merupakan fase nonreplikatif virus Hepatitis B, dalam sirkulasi hanya didapatkan partikel HBsAg berbentuk bulat dan tubular saja.

Pada pemeriksaan anti-HBs ditemukan sebanyak 3 orang (1,67 %) responden menunjukkan hasil reaktif. Hasil ini menandakan bahwa siswa-siswa tersebut sebelumnya pernah terpapar virus hepatitis B dan telah sembuh total. Siswa dengan anti-HBs positif telah memiliki kekebalan terhadap virus hepatitis B. Kekebalan tersebut muncul sebagai akibat adanya infeksi alami atau pemberian vaksinasi hepatitis B sebelumnya. Anti-HBs merupakan komponen antibodi yang secara khusus mampu menghambat penempelan virus dan masuknya virus Hepatitis B ke dalam sel inang. Kehadiran Anti HBs merupakan faktor penting dalam diagnosis dan prognosis infeksi virus Hepatitis B (Amtarina, 2006). Menurut Sinaga dkk (2018) anti-HBs merupakan antibodi yang muncul setelah vaksinasi atau setelah sembuh dari infeksi VHB. Pada hepatitis B akut, anti HBs muncul beberapa minggu setelah HBsAg menghilang.

Sebagian besar siswa yang diperiksa dengan metode rapid tes ini menunjukkan hasil non-reaktif baik pada pemeriksaan HBsAg maupun anti-HBs. Pada pemeriksaan HBsAg ditemukan sebanyak 179 siswa (99,44 %) dengan hasil non-reaktif. Sedangkan pada pemeriksaan anti-HBs ditemukan sebanyak 177 siswa (98,33 %) dengan hasil non-reaktif. Hasil ini mengindikasikan bahwa sebagian besar siswa terbebas dari infeksi virus hepatitis B atau telah pulih dari infeksi akut virus hepatitis B.

Siswa-siswa dengan hasil negatif pada pemeriksaan HBsAg dan Anti-HBs menunjukkan tidak terinfeksi virus Hepatitis B namun belum memiliki kekebalan terhadap infeksi virus Hepatitis B. Siswa-siswa ini selanjutnya dapat direkomendasikan untuk mendapatkan vaksinasi untuk mencegah infeksi hepatitis B di masa mendatang. Sedangkan untuk siswa-siswa dengan hasil anti-HBs positif perlu melakukan pemeriksaan lanjutan untuk mengetahui titer antibodi yang dimiliki. Jika didapatkan kadar antibodi di atas ambang batas, maka pemberian vaksinasi tidak diperlukan. Vaksin virus Hepatitis B mengandung protein HBsAg yang telah dipurifikasi tanpa mengandung asam nukleat virus, sehingga pemberian cukup aman tanpa resiko transmisi virus Hepatitis B. Vaksin akan merangsang pembentukan Anti-HBs dalam kurun waktu satu bulan pada sekitar 40% penerima vaksin.

Simpulan dan Saran

Karakteristik responden berdasarkan umur sebagian besar berumur antara 16-18 tahun, yaitu sebanyak 177 orang (98,33 %) dan berjenis kelamin perempuan sebanyak 132 orang (73,33%). Terdapat peningkatan pengetahuan siswa tentang penyakit hepatitis B, yaitu sebanyak 94% pengetahuan siswa memiliki kategori baik setelah diberikan penyuluhan. Terdapat 1 orang (0,56 %) siswa terinfeksi virus Hepatitis B dan 3 orang (1,67 %) siswa memiliki kekebalan terhadap virus Hepatitis B.

Puskesmas atau lembaga-lembaga yang bergerak di bidang pengendalian Hepatitis B agar meningkatkan program promosi kesehatan ke sekolah-sekolah sehingga meningkatkan kesadaran dan kepedulian siswa terhadap infeksi hepatitis B. Skrining Hepatitis B agar dijadikan salah satu program sekolah yang bekerja sama dengan Puskesmas setempat.

Daftar Pustaka

1. Amtarina, Rina. 2006. Faktor Risiko Hepatitis B Pada Tenaga Kesehatan Kota Pekanbaru : FK Universitas Riau. Riau.
2. Baumert TF, R. Thimme, FV Weizsäcker. 2007. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007 January 7; 13(1): 82-90
3. Bratanata, J., R.A. Gani, dan T.H Karjadi. Proporsi Infeksi Virus Hepatitis B Tersamar pada Pasien yang Terinfeksi Human Immunodeficiency Virus. Laporan Penelitian. Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI/RSCM : Jakarta
4. Dienstag, J. L. 2008. Hepatitis B Virus Infection. *New England Journal of Medicine* 359(14): p1486–1500.
5. Fields B N., Knipe D M., Howley P M. 2005. *Virology*. 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia
6. Greenwood D, Richard S, John P, Mike B. 2007. *Medical Mikrobiologi*. 17th ed. Churchill LivingStone Elsevier. USA.
7. Hadi, M.I dan M.Y. Alamudi. 2017. Skrining Hepatitis B Surface Antibody (HbsAb) pada Remaja di Surabaya dengan Menggunakan Rapid Test. *Journal of Health Science and Prevention*, Vol.1(2). 93-6
8. Infodatin. 2016. Situasi dan Analisis Hepatitis. Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI : Jakarta
9. Kemenkes RI. 2016. Sebagian Besar Kematian Akibat Hepatitis Virus Berhubungan dengan Hepatitis B dan C Kronis. <http://www.depkes.go.id/article/view/16042700001/sebagian-besar-kematian-akibat-hepatitis-virus-berhubungan-dengan-hepatitis-b-dan-c-kronis.html>. Diakses 30 Januari 2019
10. KemenkesRI. 2013. *Riskesmas 2013*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI : Jakarta
11. KemenkesRI. 2017. *Riskesmas 2017*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI : Jakarta
12. Pasaribu, D.M.R., TT. Patogenesis Virus Hepatitis B. Bagian Mikrobiologi FK UKRIDA: Jakarta
13. Pratomo, S. 2015. Pengaruh Strategi Penyuluhan dan Tingkat Pendidikan Terhadap Kepedulian Kesehatan Lingkungan. *Metodik Didaktik* Vol. 9, No. 2, Januari 2015
14. Sinaga, H., I. Latif, dan N. Pangulu. 2018. Pemeriksaan Hepatitis B Surface Antigen Hbsag) Dan Anti Hbs Pada Ibu Hamil Sebagai Skrining Penularan Hepatitis B. *Jurnal Riset Kesehatan*, 7 (2), 2018, 80 – 84
15. Sherlock S, Dooley J. 2002. *Disease of The Liver And Biliary System*. Edisi ke 11. Blackwell Sci : London.
16. Ventiani, N., S. Satri, dan D. Pertiwi. 2014. Frekuensi HBsAg Positif pada Uji Saring Darah di Palang Merah Indonesia Cabang Padang Tahun 2012. *Jurnal Kesehatan Andala*. Vol 3(1). 924-7

Burhannudin, Cok Dewi Widhya Hana Sundari, I Wayan Merta, I Gede Sudarhanto, I Gusti Agung Dewi Sarihati, Nyoman Jima, Heri Setiyo, Ikti, Ida Ayu Made Sri Arjani, Nyoman Mastra, I Gusti Ayu Sri Dhyana Putri, I Wayan Karta, Nur Habibah (Penyuluhan Kesehatan dan Pemeriksaan Skrining HBsAg dengan Metode Rapid Test...)

17. Wahyudi, R. 2017. Hepatitis. Bagian/SMF Ilmu Penyakit Dalam FK Unud : Denpasar
18. Wijayanti, I.B. 2016. Efektivitas Hbsag – Rapid Screening Test Untuk Deteksi Dini Hepatitis B. Jurnal KesMaDaSka
19. World Health Organization. 2017. Guidelines On Hepatitis B and C Testing. Tersedia dari: <http://www.who.int/>

Penyuluhan Kesehatan dan Pemeriksaan Skrining HBsAg dengan Metode Rapid Test Pada Siswa SMK Pariwisata Di Wilayah Ubud

ORIGINALITY REPORT

41 %
SIMILARITY INDEX

41 %
INTERNET SOURCES

9 %
PUBLICATIONS

12 %
STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1 ejournal.poltekkes-denpasar.ac.id **21** %
Internet Source

2 ejournal.poltekkes-smg.ac.id **4** %
Internet Source

3 www.poltekkes-denpasar.ac.id **3** %
Internet Source

4 www.atlm.web.id **2** %
Internet Source

5 id.123dok.com **2** %
Internet Source

6 Submitted to Udayana University **1** %
Student Paper

7 www.repository.poltekkes-kdi.ac.id **1** %
Internet Source

8 ejournal.upi.edu **1** %
Internet Source

Submitted to iGroup

9

Student Paper

1 %

10

repository.usd.ac.id

Internet Source

<1 %

11

text-id.123dok.com

Internet Source

<1 %

12

journal2.unusa.ac.id

Internet Source

<1 %

13

jurnalfpk.uinsby.ac.id

Internet Source

<1 %

14

repositori.usu.ac.id

Internet Source

<1 %

15

sehatnegeriku.kemkes.go.id

Internet Source

<1 %

16

repository.unimus.ac.id

Internet Source

<1 %

17

seacucumberjellygoldg.blogspot.com

Internet Source

<1 %

18

www.kemkes.go.id

Internet Source

<1 %

19

docobook.com

Internet Source

<1 %

20

issuu.com

Internet Source

<1 %

21	repository.poltekkes-kdi.ac.id Internet Source	<1 %
22	123dok.com Internet Source	<1 %
23	Dina Fitriah, Sri Marwanti, Ernoiz Antriyandarti. "ANALISIS PERMINTAAN BERAS ORGANIK DI KOTA SURAKARTA", Jurnal Social Economic of Agriculture, 2020 Publication	<1 %
24	docplayer.info Internet Source	<1 %
25	journal.fk.unpad.ac.id Internet Source	<1 %
26	media.neliti.com Internet Source	<1 %
27	poltekkes-sorong.e-journal.id Internet Source	<1 %
28	repository.poltekkes-denpasar.ac.id Internet Source	<1 %
29	s3.bukalapak.com Internet Source	<1 %
30	S Surmiasih, Hernovi Aprida, Hardono Hardono, Riska Hediya Putri. "Pengetahuan tentang penyakit hepatitis B dengan perilaku pemeriksaan HBsAg pada ibu hamil di	<1 %

Puskesmas", Wellness And Healthy Magazine, 2020

Publication

31

repository.unusa.ac.id

Internet Source

<1 %

32

www.prosehat.com

Internet Source

<1 %

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography On

Primers application with the Tso31 gene target in the molecular identification of *Taenia solium*

by Burhannuddin Burhannuddin

Submission date: 11-Oct-2021 11:39AM (UTC+0700)

Submission ID: 1670759859

File name: ith_the_Tso31_gene_target_in_the_molecular_identification_of.pdf (265.28K)

Word count: 3101

Character count: 15803

Research Article

1 Primers application with the Tso31 gene target in the molecular identification of *Taenia solium*

1 Nur Habibah, Heri Setiyo Bakti*, Ni Wayan Rika Kumara Dewi, Luh Putu Rinawati, Burhannuddin, Aprilia Rakhmawati

19 Department of Medical Laboratory Technology, Poltekkes Kemenkes Denpasar, Indonesia

*Corresponding author: herisetiyob7@gmail.com

1 ABSTRACT

Background: taeniasis is a zoonotic disease caused by *Taenia spp.* Human taeniasis caused by *Taenia solium* can be acquired after consumption of raw insufficiently cooked infected pork meat. Pigs are intermediate host for *T.solium*. Pigs acquired this infection by eating human feces that contained *T.solium* eggs. Pigs infected with *T.solium* can be transmitted to humans. **Purposes:** identification of *T.solium* in pig is important because it is indicator of *T.solium* transmission. Microscopic examination of *T.solium* eggs is considered less effective and efficient so that many other methods are developed for *T.solium* detection such as molecular and immunology. **Method:** This method used specific primer which can detect the Tso31 gene in *T.solium*. Tso31 gene is one of the most promising antigens to differentiate *T.solium* from *T.saginata*. Pig feces samples were taken by random sampling technique from 7 pig farms in Denpasar. **Result:** from the 30 samples, we found one sample that which gave a single amplification product of 234 bp. This indicates that the pig farms in Denpasar have been infected with *T.solium*. **Conclusion:** it is necessary to do meat inspection properly in the market as well as health education about the dangers and impacts of *T.solium* infection in the community.

Keywords: taeniasis, taenis solium, tso31 gene target

1 INTRODUCTION

1 Taeniasis is a zoonotic disease caused by *Taenia spp.* There are three species which can infect humans: *Taenia saginata*, *Taenia solium*, and *Taenia asiatica*. This disease is still endemic in the developing country and has a great importance for public health (1). The human is the definitive host for these three species and harbour the adult tapeworm in the small intestine. Cattle are the intermediate host for *T.saginata*, while the pigs are the intermediate host for *T.solium* and *T.asiatica* (2).

1 Human taeniasis/cysticercosis caused by *T.solium* can be acquired after consumption of raw insufficiently cooked infected pork meat, which subsequently develops to the adult tapeworm in the human small intestine (3). Taeniasis in humans can manifest as asymptomatic or minimally symptomatic intestinal carriage or as infection with cysticerci, predominantly in the eyes, muscle, subcutaneous, and neural tissues (4).

15 Neurocysticercosis is an infection caused by *T.solium*. Neurocysticercosis is considered to be the most common cause of acquired epilepsy

and is thought to contribute up to 30% of epilepsy cases in the endemic areas (5,6).

T.solium has a global distribution with significant economic and public health impacts.

The impacts of *T.solium* causes important economic losses, especially in the meat sector, and represent a food safety issue rather than a serious public health problem especially for the pork eating populations, as taeniasis rarely causes serious clinical signs and symptoms (2,7).

Pig is the natural animal intermediate host for *T.solium*. Pigs being coprophagic animals, usually acquired infection by direct consumption of human feces that contain *T.solium* eggs, or indirectly via contaminated water, vegetation/foods, or soil. When ingested, the eggs liberate hexacanth embryos or oncospheres in the gastrointestinal tract (3).

Animal husbandry and farming practices in Indonesia especially in Bali still remain simple and close to residential areas. Although the breeders raise pigs in pens. However, sanitation and cleanliness of the cage is not carried out properly. Balinese people's habit of eating raw pork can also be a source of *T.solium* infection.

Moreover, small-scale pig husbandry in Bali has become one of the major sources of some. Consumption of uninspected pig meat is the major source of human *T.solium* taeniasis and consequently, a major risk factor for human and pig (8). Identification of *T.solium* in pigs is important because it is an indicator of *T.solium* transmission and the risk of taeniasis/cysticercosis in the carrier or the immediate environment (9,10).

For many years, the laboratory diagnosis of taeniasis has been based on the detection of eggs by microscopic examination from fecal samples, which still remains the routine laboratory diagnosis in most laboratories. Recent studies reveal that microscopic examination alone is not reliable to differentiating

the species of *Taenia* (11). Microscopic examination also has low sensitivity and can not distinguish the morphology of *T.solium* and *T.saginata* eggs (10).

Newer methods like immunological, and molecular methods have been used to detect *T.solium*, while a combination of two or more methods appears to provide higher sensitivity (3). Up to now the only reliable technique to distinguish *Taenia* eggs is PCR (8).

Molecular biology has been employed to detect parasites in order to enhance the identification and characterization of parasites such as *T.solium*. The goal of this study was to detect *T.solium* in pigs from fecal samples using PCR method with h specific primers which can detect the Tso31 gene in *T.solium*.

METHODS

This study was used to detect taeniasis in pig farms in Denpasar, Bali. The population in this study were pig farms in Denpasar city. There are seven pig farms in Denpasar, Bali. The owner who has agreed to the informed consent is followed up by taking 30 samples of pig feces.

The samples was obtained using a random sampling technique from 7 pig farms in Denpasar. Sufficient pork feces were taken using a sterile stick. Feces samples were added with 2.5% Potassium dichromate, in a ratio of 1:2. The sample was placed in the sample container that has been provided and closed properly and stored at the room temperature. Stool samples were preserved with 2.5% potassium dichromate added with aquadest. The samples were centrifuge at 14,000 rpm for 10 minutes and the supernatant was discarded. After that, the samples were washed with aquadest three times (7). DNA from stool samples can be extracted using QIAamp-Fast DNA Stool Mini Kit (10,11).

In this study, we used a nested PCR assay was used by Mayta et al to detect the *T.solium* oncosphere protein Tso31 (7). The first master mixture of PCR was performed in a total volume consisting of 25 μ l, containing of 3 mM $MgCl_2$, 200 μ M deoxynucleoside triphosphate, 0.2 μ g/ μ l BSA, 0.8 μ M primer 1, 0.125 U Taq Polymerase, and 2.0 μ l of sample. PCR amplification was carried out in Biometra TAdvar5d. The first PCR amplification utilized an initial denaturation step at 95°C for 3 min, followed by 25 amplification cycles, each consisting of a denaturation step at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min. The final extension at 72°C for 10 min. Subsequently, PCR-amplified products were electrophoresed using 2% agarose gel. The gels were stained with ethidium bromide (10 μ g/ml) for 10 min. The stained gels were observed in a transilluminator and documented.

The second PCR was carried out in Biometra TAdvar5d. The second master mixture of PCR was performed in a total volume of 25 μ l, containing 2.5 mM $MgCl_2$, 200 μ M deoxynucleoside triphosphate, 0.2 μ g/ μ l BSA, 0.8 μ M primer 1, 0.125 U Taq Polymerase, and 2.0 μ l of sample. The second PCR amplification consisted of an initial denaturation step at 95°C for 3 min, followed by 25 amplification cycles, each consisting of a denaturation step at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min. The final extension at 72°C for 10 min. 2 μ l of PCR-amplified products were electrophoresed using 2% agarose gel. The gels were stained with ethidium bromide (10 μ g/ml) for 10 min. The stained gels were observed in a transilluminator and documented.

RESULT

From 30 samples, we obtained one sample which gave a single amplification product of 234 bp (Figure 1 and 2)

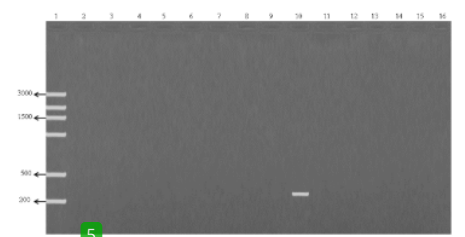


Figure 1. Tso31 nested-PCR amplification using DNA extracted from different sources. Electrophoresis was performed using 10 μ l of amplification products. Lane 1 DNA ladders (solis Biodyne). Lanes 2 to 14, DNA from stool sample code A to M. Lane 16, DNA from stool sample code V. Lane 16, negative control.

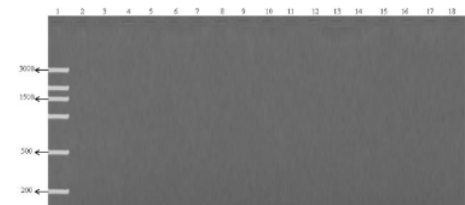


Figure 2. Tso31 nested-PCR amplification using DNA extracted from different sources. Electrophoresis was performed using 10 μ l of amplification products. Lane 1 DNA ladders (solis Biodyne). Lanes 2 to 9, DNA from stool sample code N to U. Lanes 10 to 17, DNA from stool sample code W to D1. Lane 18, negative control.

DISCUSSION

Molecular biology tools have been developed to detect parasites like *T.solium*. There are some studies have been conducted to detect *T.solium* using PCR based technology. Mayta et al. performed the nested PCR method using specific primer which can detect Tso31 gene in *T.solium*. Nested PCR can specifically amplify the DNA of *T.solium* without cross-reacting with other parasites in the human intestine, such as *T.saginata*. Karamon et al described that nested PCR performed by Mayta et al.,(12) was the most useful method with requiring the least corrections during optimization (13).

The specific primer that was used can detect the Tso31 gene on *T.solium*. This method was the best method since it does not produce cross reaction with other parasites, including parasites from *Taenidae* family, which may be detected in pigs (7). Tso31 is a 31.3 kDa excretory/secretory oncosphere antigen present in *T.solium*. Tso31 gene is one of the most promising antigens to differentiate *T.solium* from *T.saginata*. Since this gene is presented in *T.solium* but not in *T.saginata*, it was recommended for differential diagnosis (14).

Verastegui et al. showed that oncosphere antigen of *T.solium* with molecular masses of 31.3 kDa is unique. This oncosphere antigen did not give reaction with other cestode infections such as *T.saginata*. Moreover, sera from pigs with antibodies to this oncosphere antigen did not cross react with immature *T.solium*, extracts from *T.solium* metacestodes, and *T.saginata* whole oncosphere (15).

Molecular methods provide a sensitive tool for identification of *Taenia spp.* and very useful for the accurate identification of cestode samples. Yamasaki et al. showed that molecular method like PCR can detect taeniid DNA in egg-free fecal samples where taeniid eggs are not present. They also suggested that PCR technique they had done seems to be dependent on the volume of fecal samples and the conditions of sample storage (15).

PCR method using specific primers to detect DNA in *Taenia spp.* has great potential in detecting *T.solium*. In addition, the PCR method is also relatively fast and sensitive for parasite identification (16,17). The molecular method is one of the methods developed to overcome the difficulty of identifying *Taenia* through microscopic examination. The difficulty of distinguishing species of *Taenia* by microscopic examination can lead to misidentification and improper treatment (18).

Proper diagnosis of the *Taenia* infection can give a proper treatment. Molecular method can differentiate between strains and provides an easy method for identification of *Taenia* (19). Proper and accurate identification of *Taenia* is required for monitoring disease prevention and vector control strategies.

Prevention of *T.solium* in pigs can be done by implementing hygienic pig farms with attention to environmental sanitation (20)(21). The pig breeders can provide cystidal pigs as anti-worm treatment (22). Precautions, control, and eradication of *T.solium* infection are very important. Humans can become infected with *T.solium* if they eat pork infected *T.solium*. Meat inspection in the market can be done to prevent this infection. This is so that pork circulating in the community is free from pathogens, including *T.solium* (23). Local government can give health education to community about the dangers of this infection (24). Information on how to properly cook pork needs to be socialized to the whole community (24,25).

CONCLUSION

We found one sample of pig stool was positive for *T.solium*. This sample comes from a pig farm which has 200 pigs. This pig farm has have less stable sanitation than other farms. This indicated that pigs in Denpasar have been exposed to *T.solium*. Therefore, local government must take an action to prevent and eradicate of *T.solium* from being transmitted to humans.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by Poltekkes Kemenkes Denpasar, Board for Development and Empowerment Human Resources of Health - The Ministry of Health Republic Indonesia.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to declare. All co-authors have seen and agree with the contents of the manuscript. We certify that the submission is original work and is not under review at any other publication.

REFERENCES

1. Ito A, Nakao M, Wandra T. Human taeniasis and cysticercosis in Asia. *Lancet*. 2003;362:1918–20.
2. Okello AL, Thomas LF. Human taeniasis: current insights into prevention and management strategies in endemic countries. *Risk Manag Healthc Policy*. 2017;10:107–16.
3. Symeonidou I, Arsenopoulos K, Tzilves D, Soba B, Gabriël S, Papadopoulos E. Human taeniasis/cysticercosis: A potentially emerging parasitic disease in Europe. *Ann Gastroenterol*. 2018;31(4):406–12.
4. Aung AK, Spelman DW. Taenia solium Taeniasis and Cysticercosis in Southeast Asia. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(5):947–54.
5. Ito A, Yanagida T, Nakao M. Recent advances and perspectives in molecular epidemiology of Taenia solium cysticercosis. *Infect Genet Evol*. 2016;40:357–67.
6. Montresor A, Palmer K. Taeniasis / cysticercosis trend worldwide and rationale for control. *Parasitol Int*. 2006;55:1–4.
7. Mayta H, Gilman RH, Prendergast E, Castillo JP, Tinoco YO, Garcia HH, et al. Nested PCR for specific diagnosis of Taenia solium taeniasis. *J Clin Microbiol*. 2008 ;46(1):286–9.
8. Murrell KD, Dorny P, Flisser A, Geerts S, Kyvsgaard NC, Mcmanus DP, et al. WHO / FAO / OIE Guidelines for the surveillance , prevention and control of taeniosis / cysticercosis. Murrell KD, editor. Paris; 2005.
9. Suriawanto N, Guli MM, Miswan. Deteksi Cacing Pita (Taenia solium L .) melalui Uji Feses pada Masyarakat Desa Purwosari Kecamatan Torue. *Biocelbes*. 2014 ;8(1):17–28.
10. Del Brutto OH, García HH. Taenia solium Cysticercosis - The lessons of history. *J Neurol Sci*. 2015;359(1–2):392–5.
11. Qiagen. QIAamp-Fast DNA Stool Mini Kit: Quick-Start Protocol. Qiagen; 2017.
12. Karamon J, Sroka J, Cencek T, Różycki M, Chmurzyńska E, Zajac EB, et al. Optimisation and comparison of three PCR procedures for molecular identification of Taenia solium. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2013;57(12):507–18.
13. Morales-Gomez MA, Gárate T, Blocher J, Devleeschauwer B, Smit GS., Schmidt V, et al. Present status of laboratory diagnosis of human taeniosis / cysticercosis in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36:2029–40.
14. Vargas-calla A, Gomez-puerta LA, Lopez MT, Garcia HH, Gonzalez AE. Molecular characterization of the Taenia solium Tso31 antigen and homologous of other Taenia species from Peru. *Parasitol Res*. 2019;436–7.
15. Verastegui M, Gilman RH, Garcia HH, Gonzales AE, Arana Y, Jeri C, et al. Prevalence of Antibodies to Unique Taenia solium Oncosphere Antigens in Taeniasis and Human

- and Porcine Cysticercosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69(4):438–44.
16. Miguel González L, Montero E, Puente S, López-Velez R, Hernández M, Sciutto E, et al. PCR tools for the differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis from different geographical locations. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002 Apr;42(4):243–9.
17. Yamasaki H, Allan JC, Sato MO, Nakao M, Sako Y, Nakaya K, et al. DNA Differential Diagnosis of Taeniasis and Cysticercosis by Multiplex PCR. *J Clin.* 2004;42(2):548–53.
18. Thanchomnang T, Tantrawatpan C, Intapan PM, Sanpool O. Rapid Molecular Identification of Human Taeniid Cestodes by Pyrosequencing Approach. *PLoS One.* 2014;9(6):1–7.
19. Biswal D. Molecular Methods For Diagnosis of Zoonotic Helminths: Can They Be Made Accessible to the Common Man? *Adv Genet Eng.* 2016;5(2):1–5.
20. Gilman RH, Gonzalez AE, Llanos-zavalaga F, Tsang VCW, Garcia HH, Working C. Prevention and control of *Taenia solium* taeniasis / cysticercosis in Peru. *Pathog Glob Health.* 2012;106(5):312–8.
21. Flisser A. State of the art of *Taenia solium* as compared to *Taenia asiatica*. *Korean J Parasitol.* 2013;51(1):43–9.
22. Gabriël S, Dorny P, Mwape KE, Trevisan C, Braae UC, Magnussen P, et al. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: The best way forward for sub-Saharan Africa? *Acta Trop.* 2016;165:252–60.
23. Becti HS, Habibah N, Rinawati LP, Pradnya Yasa NPCD, Rindi ODG, Dewi NKAK, et al. Identifikasi *Taenia solium* secara Mikroskopis pada Peternakan Babi. *J Kesehat.* 2021 Apr;12(1):74.
24. Widarso H, Margono SS, Purba WH, Subahar R. Prevalensi dan distribusi taeniasis dan sistiserkosis. *Makara, Kesehat.* 2001;5(2):34–8.
25. Dharmawan NS, Swastika IK, Putra IM, Wandra T, Sutisna P, Okamoto M, et al. Present Situation and Problems of Cysticercosis in Animal in Bali and Papua. *J Vet.* 2012;13(2):154–62.

Primers application with the Tso31 gene target in the molecular identification of Taenia solium

ORIGINALITY REPORT

36%

SIMILARITY INDEX

30%

INTERNET SOURCES

20%

PUBLICATIONS

7%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

www.sciencegate.app

Internet Source

12%

2

www.ncbi.nlm.nih.gov

Internet Source

3%

3

jurnal.umj.ac.id

Internet Source

3%

4

www.medrxiv.org

Internet Source

2%

5

H. Mayta, R. H. Gilman, E. Prendergast, J. P. Castillo, Y. O. Tinoco, H. H. Garcia, A. E. Gonzalez, C. R. Sterling. "Nested PCR for Specific Diagnosis of Taenia solium Taeniasis", Journal of Clinical Microbiology, 2007

Publication

2%

6

Francesca Bosco, Vincenzo Musolino, Micaela Gliozzi, Saverio Nucera et al. "The muscle to bone axis (and viceversa): An encrypted language affecting tissues and organs and yet

2%

to be codified?", Pharmacological Research,
2021

Publication

7	journals.plos.org Internet Source	2%
---	--------------------------------------	----

8	Cristian A. Alvarez Rojas, Alexander Mathis, Peter Deplazes. "Assessing the Contamination of Food and the Environment With Taenia and Echinococcus Eggs and Their Zoonotic Transmission", Current Clinical Microbiology Reports, 2018 Publication	1%
---	--	----

9	www.annalsgastro.gr Internet Source	1%
---	--	----

10	www.dovepress.com Internet Source	1%
----	--------------------------------------	----

11	Submitted to unbosque Student Paper	1%
----	--	----

12	Xianshu Li, Qianqian Huang, Jing Xu. "Renalase levels and genetic variants are associated with preeclampsia: a hospital based study in Chinese cohort", Research Square, 2020 Publication	1%
----	--	----

13	Ana Vargas-Calla, Luis A. Gomez-Puerta, Maria T. Lopez, Hector H. Garcia, Armando E. Gonzalez. "Molecular characterization of the Taenia solium Tso31 antigen and homologous	1%
----	--	----

of other Taenia species from Peru",
Parasitology Research, 2019

Publication

14

Submitted to Jawaharlal Nehru Technological
University

Student Paper

1 %

15

MARSHALL W. LIGHTOWLERS. " Control of
taeniasis/cysticercosis: past practices and new
possibilities ", Parasitology, 2013

Publication

<1 %

16

123dok.com

Internet Source

<1 %

17

Boo H. Kwa. "The Parasite Chronicles",
Springer Science and Business Media LLC,
2017

Publication

<1 %

18

scientonline.org

Internet Source

<1 %

19

teknolabjournal.com

Internet Source

<1 %

20

www.medbox.org

Internet Source

<1 %

21

H. Yamasaki, J. C. Allan, M. O. Sato, M. Nakao,
Y. Sako, K. Nakaya, D. Qiu, W. Mamuti, P. S.
Craig, A. Ito. "DNA Differential Diagnosis of

<1 %

Taeniasis and Cysticercosis by Multiplex PCR", Journal of Clinical Microbiology, 2004

Publication

22

Heliana B. Oliveira, Gleyce A. Machado,
Dagmar D. Cabral, Julia M. Costa-Cruz.
"Application of Taenia saginata metacestodes
as an alternative antigen for the serological
diagnosis of human neurocysticercosis",
Parasitology Research, 2007

Publication

<1 %

23

Raúl J. Bobes, Gladis Frago, Agnès Fleury,
Martín García-Varela, Edda Sciutto, Carlos
Laralde, Juan P. Laclette. "Evolution,
molecular epidemiology and perspectives on
the research of taeniid parasites with special
emphasis on Taenia solium", Infection,
Genetics and Evolution, 2014

Publication

<1 %

24

jcm.asm.org

Internet Source

<1 %

25

openventio.org

Internet Source

<1 %

26

www.sciendo.com

Internet Source

<1 %

27

Abdul Jabbar, Charles Gauci, Marshall W
Lightowlers. "Diagnosis of human taeniasis",
Microbiology Australia, 2016

Publication

<1 %

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography On